

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1953-1954

N° 22

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie

PAR

Maurice COULET

1^{re} THESE : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES HÉMOAGGLUTININES
VÉGÉTALES, ESSENTIELLEMENT CHEZ PHASEOLUS
VULGARIS L.

2^e THESE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 4 juin 1954 devant la Commission d'examen

JURY :

M. le Professeur J. SUSPLUGAS.....	Président.
— H. DIACONO	Assesseurs.
— C. BESSIÈRE	

SOCIÉTÉ NATIONALE DES
ENTREPRISES DE PRESSE
IMPRIMERIE MONT-LOUIS
CLERMONT-FERRAND

— 1954 —

UNIVERSITE DE MONTPELLIER

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1953-1954

N° 22

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie

PAR

Maurice COULET

1^{re} THESE : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES HÉMOAGGLUTININES
VÉGÉTALES, ESSENTIELLEMENT CHEZ PHASEOLUS
VULGARIS L.

2^e THESE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 4 juin 1954 devant la Commission d'examen

JURY :

M. le Professeur J. SUSPLUGAS	<i>Président.</i>
— H. DIACONO	) <i>Assesseurs.</i>
— C. BESSIÈRE	

SOCIÉTÉ NATIONALE DES
ENTREPRISES DE PRESSE
IMPRIMERIE MONT-LOUIS
CLERMONT-FERRAND

— 1954 —

FACULTE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRES

MM.

CANALS Etienne, Professeur-Doyen	Physique.
JAULMES Paul, Professeur	Chimie analytique et toxicologie.
DOLIQUE Roger, Professeur	Chimie minérale et pharm. industrielle.
GIROUX Jean, Professeur	Pharm. galénique et pharmacodynamie.
GRANGER Robert, Professeur-Assesseur.	Chimie organique pharmaceutique.
CASTEL Pierre, Professeur	Pharmacie chimique.
MONNIER Pierre, Professeur	Chimie biologique.
SUSPLUGAS Jean, Professeur	Botanique et matière médicale.
BESSIERE Clément, Professeur	Zoologie et microbiologie.
MARIGNAN Roger, Professeur sans chaire.	

Maitres de conférences

M^{me}

HOLLANDE Germaine	Sciences naturelles.
-------------------	----------------------

Chargés de cours complémentaires

MM.

CANALS E., Professeur-Doyen	Hydrologie.
JAULMES P., Professeur	Toxicologie.
DOLIQUE R., Professeur	Pharmacie industrielle.
GIROUX J., Professeur	Pharmacodynamie.
GRANGER R., Professeur-Assesseur	Chimie-physique.
MONNIER P., Professeur	Physiologie.
SUSPLUGAS J., Professeur	Botanique.
BESSIERE C., Professeur	Zoologie.
MARIGNAN R. Professeur	Hygiène.
ASTRUC L., Chargé de cours	Législation et déontologie.
DIACONO H., Chargé de cours	Sérologie.

Chefs de travaux

MM.

LALAUURIE Marc	Histoire Naturelle.
N...	Chimie.
MESTRE Robert	Chimie.

M^{lle}

BARDET Lucette	Physique.
----------------	-----------

M.

HUGUET	Histoire Naturelle.
--------	---------------------

Professeurs honoraires

MM. A. ASTRUC, Doyen ; MOUSSERON, FAUCON, HOLLANDE, Professeurs.

Maitres de conférences honoraires

M.

FABRE.



A MA FEMME

A MES ENFANTS

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MON PERE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A Monsieur le Professeur J. SUSPLUGAS

A Monsieur le Professeur H. DIACONO

A Monsieur le Professeur C. BESSIERE

A Monsieur le Professeur D. GAUTHIER

A Madame le Professeur L. BLANQUET

A Monsieur Le Professeur R. VAURS

Et à tous mes Maîtres de l'Ecole de Médecine et Pharmacie de
Clermont-Ferrand

A Monsieur le Doyen Y. VOLMAR

A Monsieur le Professeur P. JAEGER

Et à tous mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A Monsieur le Doyen H. MARESQUELLE

A Monsieur le Professeur R. BONNET

Et à tous mes Maîtres de la Faculté des Sciences de Strasbourg

INTRODUCTION

La systématique végétale qui reposait autrefois sur des caractères morphologiques quasi exclusifs a fait peu à peu un appel croissant à des aspects sans doute moins directement accessibles de la vie des plantes, mais dont on était en droit d'attendre *a priori* des indications complétant les arguments de la floristique : ainsi la physiologie, la biochimie, l'embryologie, la génétique et la sérologie même ont été appelées à confirmer des rapprochements déjà établis ou à fournir des preuves dont on manquait.

Mais la fécondité de ces disciplines nouvelles a été très inégale : si l'embryologie a pu servir à dresser de véritables systèmes, la sérologie abordée par Mez n'a pas fourni jusque-là de démonstrations éclatantes aux systématiciens ; la biochimie ne leur apporte d'indications fidèles que dans des cas particuliers. Et c'est finalement encore le critère morphologique, floral avant tout, qui reste le plus apte à servir la systématique.

Nous nous proposons d'étudier ici un caractère biochimique de certaines Papilionacées, dont la mise en évidence procède de la technique sérologique : la présence principalement dans leurs graines de substances douées d'un pouvoir agglutinant vis-à-vis d'hématies humaines ou animales, facile à déceler à l'aide de simples extraits aqueux isotoniques.

La connaissance de ces propriétés agglutinantes chez certains végétaux est ancienne puisque les premiers travaux à leur sujet sont ceux de STILLMARK (45), en 1887, pour la ricine ; HELLIN (18), en 1891, pour l'abrine de l'Abrus ; ELFSTRAND (14), en 1898, pour la crotine du Croton ; LAU (28), en 1901, pour la robine du Robinia. Le début du siècle est marqué par une série de travaux cherchant à préciser la nature de ces agglutinines : JACOBY, OSBORNE et MENDEL, LANDSTEINER et RAUBITSCHKE (26), WIENHAUS (48), étudient les agglutinines des Papilionacées et principalement du haricot.

L'ensemble de ces travaux concluait à l'existence de substances hémagglutinantes chez les végétaux, possédant dans certains cas une toxicité élevée. Leur nature chimique restait très discutée : WIENHAUS (48) attribue à sa « Phasin » une nature complexe et peu précise, associant de façon labile le pouvoir agglutinant à une albumine et à une globuline. SCHNEIDER (43) parle de protéose, tandis qu'ELSLER et PORTHEIM (13) admettent que l'agglutinine est conjuguée aux protéines.

Un aspect nouveau de la question apparaît avec les travaux récents des Finlandais RENKONEN (40) et KOULUMIES (22), des Américains BOYD et REGUERA (6), BIRD (2), des Allemands KRUEPPE et POWILLEIT (25), des Français CAZAL et LALAUZIE (10) : alors que les agglutinines envisagées jusque-là étaient spécifiques quant aux catégories de globules sensibles, RENKONEN (40), le premier, montre qu'on peut rencontrer certaines plantes douées d'un pouvoir agglutinant bien plus grand vis-à-vis des globules humains de groupe déterminé que vis-à-vis des autres catégories ; c'est le cas pour *Vicia Cracca* et *Cytisus sessilifolius* agissant spécifiquement sur les hématies du groupe A. Cette découverte laisse entrevoir à HIRZSFELD (19) la possibilité, évidemment très hypothétique, de généraliser au moins à une partie du monde végétal la notion de différenciation groupale résultant de l'existence des antigènes A et B.

Le renouveau d'intérêt ainsi donné à la question s'accompagne de plus amples recherches sur la nature des agglutinines : BOYD et REGUERA (6) isolent du haricot de Lima des globulines anti A. RENKONEN (41) apparente l'agglutinine de *Vicia Cracca* aux muco-protéines. Mais l'aspect pseudosérologique du problème des agglutinines, avec leur inégal degré de spécificité incitait à des recherches immunologiques ; RENKONEN cherche à mettre en évidence la nature antigénique de la substance anti A de *Vicia Cracca* en préparant un sérum de lapin antivicia dont il étudie le comportement. KOULUMIES (23), BIRD (2), et en dernière date CAZAL et LALAUZIE (10) se penchent sur les rapports possibles entre certaines agglutinines et le système des antigènes de Forssman.

Ce bref rappel des grandes connaissances concernant ce qu'on peut appeler les hémagglutinines végétales ou phytoagglutinines nous conduit à envisager le plan de cette étude dont les principaux chapitres peuvent trouver une origine dans les travaux que nous venons d'évoquer. Il nous semble malgré tout que quelques considérations très générales d'ordre technique doivent être développées auparavant : elles sont nécessaires et vont permettre, nous l'espérons, d'aborder le sujet lui-même sans ambiguïté.

Nous pensons qu'il est indispensable en matière d'agglutinines, telles que les agglutinines végétales, dont l'action s'exerce aux dépens de suspensions globulaires, de préciser avec soin les conditions dans lesquelles se font les mesures. Il est assez illusoire de chercher à comparer des résultats si ceux-ci n'ont pas été établis dans des circonstances strictement superposables. Or, à notre avis, la reproduction rigoureuse des conditions techniques en cette matière est difficile à obtenir : si on peut aisément répondre de la constance de

la température à laquelle s'effectue la réaction, on ne peut, par contre, garantir la similitude de 2 extraits issus du même lot de graines, car il s'agit en l'occurrence d'une préparation biologique et non d'une substance chimiquement définie et mesurable. De même, si une attention toute spéciale et une technique particulièrement soignée permettent de travailler, à des moments différents, avec des suspensions globulaires de concentration exactement identique, le seul fait de changer d'échantillon ou de donneur de sang n'introduit-il pas la possibilité d'une variation d'agglutinabilité ? Certes, l'amplitude des écarts qui peuvent être sous la dépendance de ces facteurs reste minime, mais il n'en va pas de même de ceux qu'entraîne une approximation relative dans la préparation des extraits ou des suspensions globulaires : nous en verrons quelques exemples. Aussi pour un travail où de nombreuses déterminations peuvent être nécessaires à des époques plus ou moins éloignées, si l'on ne veut s'astreindre à un excès de précautions fastidieuses, et, malgré tout, théoriquement discutables, est-il de règle absolue d'introduire, dans chaque type de mesures, une série témoin menée parallèlement aux séries d'étude ; un tel témoin, préparé en même temps que la réaction en cours, à l'aide du même extrait, avec les mêmes suspensions globulaires, soumis aux mêmes conditions et lu au même moment, donne aux résultats obtenus une valeur relative inattaquable.

Néanmoins, ceci ne veut pas dire qu'il faille utiliser au gré des circonstances occasionnelles des suspensions globulaires de concentration très différente sous le seul prétexte que la présence constante d'une série témoin confère aux chiffres qu'on obtient une sécurité suffisante. En effet, la sensibilité de la réaction d'agglutination et la facilité de la lecture (celle-ci conditionnant en partie celle-là) peuvent dépendre de quelques facteurs que nous nous proposons d'étudier.

Nous allons ainsi passer en revue l'influence de la suspension globulaire, de la température, du temps de lecture, de la centrifugation et de l'addition de substances spéciales.

Tout en permettant d'établir les conditions techniques les plus favorables à l'étude de la phytoagglutinine, cette revue peut nous apporter quelques renseignements quant à sa nature.

INFLUENCE DE LA SUSPENSION GLOBULAIRE

Nous laissons de côté ici les questions de spécificité vis-à-vis d'un groupe sanguin ou d'une espèce animale.

Concentration

Nous avons préparé un certain nombre de suspensions globulaires, aux dépens du même culot d'hématies lavées. Chacune de ces suspensions a été ajoutée, dans une série de dilutions d'extrait de *Phaseolus*, à raison d'une goutte par tube de 0 cm³ 4. Après 2 heures de contact à température ordinaire, on lit les taux d'agglutination limite, selon la concentration de la suspension globulaire utilisée.

Cette expérience, effectuée à plusieurs reprises en faisant varier l'origine des globules, nous a montré que la lecture la plus facile en même temps que la plus grande sensibilité s'obtiennent quand on utilise des suspensions d'environ 200.000 hématies par mm³, dont on ajoute une goutte pour 0 cm³ 4 de la dilution d'agglutinine.

L'emploi de suspensions nettement plus riches, 4.000.000 au mm³, par exemple, entraîne une perte de sensibilité, le taux d'agglutination s'abaissant à un chiffre 4 fois plus faible. Les suspensions plus diluées au contraire présentent la même sensibilité, mais sont de lecture plus délicate, et beaucoup plus fragiles à l'égard d'agents hémolytiques accidentellement présents dans les tubes : c'est le cas des agents mouillants en usage pour nettoyer la verrerie, quand le rinçage n'est pas particulièrement soigneux.

Lavage

L'utilisation de globules non lavés pour préparer les suspensions introduit dans les tubes une petite quantité de plasma provenant du sang considéré. Il est évident qu'on a intérêt à maintenir le milieu aussi exempt que possible d'éléments étrangers à la réaction, et d'autant plus dans le cas présent qu'il ne s'agit point d'une impureté toujours identique à elle-même mais pouvant varier avec les échantillons. D'une manière générale, nous avons employé pour préparer les suspensions des culots globulaires lavés 3 fois par centrifugation à l'eau salée isotonique.

Après LANDSTEINER et RAUBITSCHKE (26) pour les sérums de poule et de cheval, BOURDILLON (4) signale le puissant effet d'inhibition manifesté à l'égard de l'agglutinine par certains sérums normaux, de poule et de furet, ainsi que par « le sérum immunisé contre l'influenza A » et l'obligeant à n'utiliser que d'hématies soigneusement lavées ; nous avons recherché dans nos conditions expérimentales habituelles quelle pouvait être l'influence d'hématies non lavées.

En pratiquant, à concentration globulaire égale, des titrages à l'aide de sang de mouton et de quelques sangs humains,

nous n'avons observé aucune différence dans les taux d'agglutination selon que les suspensions globulaires étaient faites d'hématies lavées ou non. Ceci ne signifie d'ailleurs pas qu'on ne puisse rencontrer, même parmi les sangs humains, des plasmas doués d'un pouvoir inhibiteur suffisant pour que les suspensions globulaires correspondantes soient moins sensibles en l'absence de lavage préalable : au contraire, l'observation de BOURDILLON (4) d'un immun-sérum d'influenza rend cette hypothèse non seulement possible, mais encore riche de développements. Nous aurons l'occasion de reconsidérer cette question. Nous pouvons dire déjà qu'au cours de l'expérimentation qu'elle nous a amené à entreprendre, nous n'avons, en manipulant du sérum de cheval, constaté aucun effet inhibiteur du sérum de cheval normal. Il n'est pas sans intérêt de rapprocher du travail de BOURDILLON (4) les recherches faites sur l'ovomucine par LANNI, SHARP, CSAKY et BEARD (27), et sur les mucoprotéines isolées du plasma humain par STULBERG, SCHAPIRA, ROBINSON, BABINSKY et FREUND (46) : dans les deux cas, les auteurs ont mis en relief la possibilité d'inhiber par certaines mucoprotéines, l'hémagglutinine du virus de l'influenza A.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'activité des hémagglutinines quelles qu'elles soient est conditionnée par la température : certaines n'agissent qu'à basse température, telles les agglutinines dites « froides » des sujets atteints de pneumonie à virus, certaines, au contraire, agissent mieux à température ordinaire comme l'hétéroagglutinine anti H, ainsi que les agglutinines du système A B O, certaines autres à 37-40° comme les agglutinines anti Rh, d'autres enfin sont assez indifférentes aux conditions thermiques.

Le titrage des agglutinines végétales s'effectue selon les auteurs à 37° ou à température ordinaire : DIACONO (11), pour l'Abrine, opère à 37°, tandis que RENKONEN (40) et KOULUMIES (22), pour *Vicia Cracca* et *Cytisus sessilifolius*, WIENHAUS (48), pour le *Phaseolus*, ne travaillent qu'à température du laboratoire. C'est à CAZAL et LALAURIE (10) qu'on doit la seule étude comparée du comportement d'agglutinines végétales en fonction de la température : alors qu'ils n'observent aucune différence dans l'activité de l'extrait de *Vicia Cracca* à 37° et à 20°, l'étude d'*Ulex provincialis* (Lois.) leur permet de mettre en évidence une température optimale autour de 20°, à laquelle l'action de l'extrait est très sensiblement supérieure à celle qu'elle est à 37° et surtout à 4°.

Nous avons soumis l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* à des essais de même nature qui font apparaître une activité

superposable à 37° et à 17°, cependant qu'à 4° on n'observe qu'un titre assez nettement inférieur, les 3 lectures étant faites après 2 heures de contact.

INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT

Le délai qui s'écoule entre la mise en place de la réaction et la lecture est variable, chaque auteur fixant son choix sur une durée qui va de 15' (DIACONO) à 2 heures (KOULUMIES) ou même 4 à 12 heures (SCHNEIDER). Nous avons recherché dans quelles limites cette période de contact pouvait par sa longueur intervenir sur les résultats de la lecture : des lectures successives pratiquées sur une série de dilutions maintenues à température ordinaire nous ont donné comme résultats :

après 15'	positif à 1/20
après 30'	positif à 1/80
après 1 h.	positif à 1/640
après 2 h.	positif à 1/1280
après 3 h.	positif à 1/1280 et douteux à 1/2560
après 6 h.	id.
après 12 h.	id.

Le temps avant la lecture n'est donc pas indifférent et nous l'avons d'une manière générale fixé à 2 heures.

INFLUENCE DE LA CENTRIFUGATION

La lecture des agglutinations est grandement facilitée et surtout accélérée par la centrifugation : après un contact plus ou moins prolongé, elle permet la constitution d'agglutinats beaucoup plus nets et plus faciles à lire. Aussi, comprend-on que de même qu'aux séro-agglutinations bactériennes lentes s'est substituée la technique rapide de BONNEFOI et GRABAR (17), de même les hémagglutinations végétales pratiquées par certains en laissant simplement les tubes au repos [RENKONEN (40), KOULUMIES (22)] ne sont observées par d'autres qu'après une centrifugation faisant suite à ce temps de repos [DIACONO (11), CAZAL et LALAUURIE (10)].

Il semble assez naturel que cette centrifugation soit capable selon la vitesse à laquelle elle a lieu et peut-être selon sa durée d'influer sur la limite d'agglutination visible. Dans le but de confirmer cette hypothèse nous avons pratiqué l'essai simplifié suivant :

Un extrait frais de *Phaseolus vulgaris* à 10 %, préparé à 70° et mis en solution à 1/5 est dilué de proche en proche, selon les termes d'une progression géométrique, en 3 séries

semblables auxquelles on ajoute, par tube, une goutte de suspension globulaire. Après une heure de contact à température ordinaire, on constate qu'il y a agglutination jusqu'au tube 8, soit $1/1280$ par rapport à l'extrait pur. Une série est alors soumise à 5' de centrifugation à 600 tours par minute environ : la limite visible d'agglutination passe alors à $1/5120$, c'est-à-dire au tube 10. Une autre série est ensuite centrifugée 5' dans la même centrifugeuse, mais à 3.000 tours : on atteint cette fois le 12^e tube ou $1/20.480$. Il se vérifie donc bien que la vitesse de centrifugation peut agir sur le titre finalement lisible de l'agglutination. Par contre si on prolonge à vitesse égale le temps de centrifugation de 5' ou 10' on n'observe pas de modification.

INFLUENCE DE L'ADDITION DE SUBSTANCES ÉTRANGÈRES

L'étude des propriétés de l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* envisagée sur le plan « sérologique » nous a conduit à observer l'influence sur l'agglutination de substances comme la Plasma albumine de bœuf et le Dextran. Ces substances mélangées à la suspension globulaire ne modifient pas le taux final d'agglutination, mais semblent accélérer le phénomène ; nous ne précisons pas ici les conditions expérimentales qui sont décrites au chapitre sérologique.

CAUSES D'ERREURS

Nous croyons utile de signaler quelques causes d'erreurs qui pourraient dans certains cas amener l'expérimentateur à des résultats fallacieux.

Il est des extraits végétaux, particulièrement ceux qu'on obtient à partir des fruits charnus de Rosacées, dont la richesse en matières pectiques détermine des précipitations et parfois même des coagulations. Cette dernière éventualité offre peu de risques quant à la confusion possible avec une agglutination. Il n'en est pas de même des précipités qui semblent constituer par leurs particules des centres d'attraction pour les hématies : on observe alors au moment de la lecture des agglutinations, des amas dans lesquels les globules apparaissent à l'examen microscopique comme cimentés les uns aux autres par une substance amorphe.

D'autre part, la recherche des agglutinines dans des organes végétaux isolés conduit à préparer des extraits aux dépens de faibles quantités de poudre d'organes : ces extraits ne peuvent être filtrés en raison de leur volume parfois minime (centimètre cube ou même fraction de centimètre cube) et on doit

les centrifuger pour les clarifier. Etant donné la faible densité que présentent dans certains cas les particules végétales constituant la poudre, il arrive que le liquide décanté, qui va être éprouvé en présence d'hématies, en contienne quelques-unes. Ces particules semblent servir de point de fixation pour les hématies et simuler alors, surtout si la recherche de l'agglutinine s'est faite avec centrifugation, de vrais agglutinats : on pourrait conclure à une réaction légèrement positive car le nombre de ces faux agglutinats dépend de celui des particules qui leur servent d'armature, et la plupart des hématies restent en suspension. L'examen microscopique montre la texture de ces fausses images, dans lesquelles on retrouve le support végétal et les hématies qui lui sont accolées, mais qui ne présentent pas les déformations propres aux véritables agglutinations, animales ou végétales.

Ces fausses agglutinations auxquelles nous nous sommes heurté expérimentalement avaient été interprétées déjà par ROBERT (21) dont nous avons pu lire le texte intégral alors que nos travaux étaient déjà en cours : se référant à un travail de SIEGFRIED sur la possibilité d'obtenir des fausses agglutinations en présence de certaines substances minérales, tel le silicate de sodium, l'auteur allemand attribue la formation de pseudo agglutinats dans les extraits végétaux, à la précipitation de phosphates, à la présence de substances pouvant intervenir par leur état colloïdal : tanin, sapogénines.

On peut d'ailleurs supposer que ces phénomènes sont de nature électrostatique et liés à l'existence de charges électriques contraires à la surface des micelles, des particules et des globules mis en jeu.

En tenant compte de ces diverses données, nous avons utilisé la technique générale suivante pour l'étude des phytoagglutinines, sauf dans des cas particuliers que nous indiquerons en temps voulu : La drogue à étudier, sous forme de poudre sèche, est mise à digérer dans 10 fois son poids d'eau salée isotonique (ClNa à 9°/°°) : après deux heures de contact, le mélange est filtré. La recherche du pouvoir agglutinant se pratique alors sur des dilutions progressives du filtrat ainsi obtenu : ces dilutions sont préparées de proche en proche dans des tubes à hémolyse contenant un volume fixe d'eau salée, 0 cm³ 4. A l'aide d'un rhéomètre de Vernes, réglé à ce volume on introduit 0 cm³ 4 de filtrat dans le premier tube, on mélange, on prélève 0 cm³ 4 de cette première dilution qu'on introduit dans le deuxième tube. La même opération se répète successivement pour tous les tubes qui contiennent ainsi sous un volume de 0 cm³ 4 des dilutions de l'extrait croissant selon les termes d'une progression géométrique de raison 1/2. A chacun de ces

tubes on ajoute alors une goutte d'une suspension globulaire d'environ 200.000 hématies au mm^3 . Après agitation les tubes sont abandonnés deux heures à température ordinaire, et la lecture s'effectue ensuite au miroir concave.

Ayant ainsi rapidement discuté les principales conditions de simple technique qu'il est utile de connaître avant d'aborder l'étude des agglutinines végétales, nous sommes en mesure maintenant d'envisager ces dernières sous certains de leurs aspects plus précis. Nous nous consacrerons dans les pages qui suivent aux chapitres successifs ci-dessous :

Etude de la distribution des phytoagglutinines par rapport à la classification systématique ;

Etude de la phytoagglutinine dans la plante ;

Etude des propriétés physicochimiques des phytoagglutinines ;

Etude des propriétés sérologiques des phytoagglutinines, essentiellement chez le *Phaseolus vulgaris* L.

ETUDE
DE LA REPARTITION DES PHYTOAGGLUTININES
PAR RAPPORT
A LA CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE

Sans envisager encore le rôle que les agglutinines peuvent jouer dans certaines plantes, il est facile de rechercher si leur distribution parmi les groupements végétaux s'accorde ou non avec les principes qui ont régi la constitution de ces groupements.

Des diverses listes de plantes publiées par les différents auteurs intéressés par les hémagglutinines végétales, il est possible de faire une synthèse utile à cet établissement d'une opinion d'ensemble sur leur répartition botanique. Toutefois, les règles de nomenclature et une précision suffisante ne sont pas observées dans toutes les publications et il en résulte en certains cas une difficulté d'interprétation. Il nous a paru commode de présenter, comme l'ont fait RENKONEN (40) et CAZAL et LALAUURIE (10) les plantes dans l'ordre de la classification, tout en les répartissant en trois colonnes selon l'absence et la présence, avec ou sans spécificité, d'agglutinine. Les auteurs sont rappelés par une abréviation entre parenthèses :

(B.) pour BOYD (5) ;

(B.R.) pour BOYD et REGUERA (6) ;

(C.L.) pour CAZAL et LALAUURIE (10) ;

(E.P.) pour EISLER et PORTHEIM (13) ;

(Ko.) pour KOULUMIES (22) ;

(Kob.) pour KOBERT (21) ;

(R.) pour RENKONEN (40).

(Co.) pour nous-mêmes, en ce qui concerne un nombre d'ailleurs restreint de Rosales récoltées dans la région ou au jardin botanique de Clermont-Ferrand. Nous avons en principe écarté de notre étude personnelle les Légumineuses déjà très explorées de ce point de vue : en effet, deux listes importantes en ont été publiées par RENKONEN (40) et CAZAL et LALAUURIE (10). Désireux de ne pas allonger outre mesure l'énumération qui va suivre, et aussi de souligner l'importance des Légumineuses dans le domaine des agglutinines, nous les avons volontairement chassées de leur place normale selon l'Index Generum Phanerogamum de DURAND, pris pour guide ; elles seront envisagées à part d'une façon résumée.

1° LISTE DES PLANTES DONT LES SEMENCES ONT SERVI
A LA RECHERCHE D'AGGLUTININE

L'ordre est celui de l'Index de DURAND. Les Légumineuses sont exceptées.

N°	RANUNCULACEAE	Inactif	Aspécif.	Spécif
3	Thalictrum dictero carpum	B.R.		
6	Adonis estivalis	B.R.		
10	Ranunculus asiaticus	B.R.		
18	Helleborus niger	B.R.		
22	Nigella damascena	B.R.		
25	Delphinium bellamosum	B.R.		
26	Aconitum lycoctonum	B.R.		
	Aconitum napellus	Co.		
PAPAVERACEAE				
216	Papaver nudicaule	B.R.		
	Papaver orientale	B.R.		
	Papaver Rhoeas	B.R.		
220	Meconopsis baileyi	B.R.		
231	Eschscholtzia sp.	B.R.		
FUMARIACEAE				
234	Dicentra exima	B.R.		
CRUCIFERAE				
239	Matthiola bicornis	B.R.		
	Matthiola sp.	B.R.		
243	Cheiranthus Allioni	B.R.		
285	Hesperis matronalis	B.R.	M.	
317	Brassica capitata	B.R.		
	Brassica juncea v. crispifolia	B.R.		
	Brassica Rapa	B.R.		
361	Iberis sempervirens	B.R.		
	Iberis umbellata	B.R.		
411	Rapn'anus sativus	B.R.		
CAPPARIDEAE				
425	Cloeme spinosa	B.R.		
RESEDACEAE				
458	Reseda sp.	B.R.		
VIOLAREAE				
469	Viola cornuta	B.R.		
	Viola tricolor	B.R.		

N ^o —	CARYOPHYLLEAE	Inactif —	Aspécif. —	Spécif. —
569	Dianthus caryophyllus	B.R.		
569	Dianthus Chinensis	B.R.		
574	Saponaria Vaccaria	B.R.		
577	Lychnis occulta	B.R.		
PORTULACEAE				
605	Portulaca sp.	B.R.		
614	Calandrinia speciosa	B.R.		
	Calandrinia umbellata	B.R.		
TERNSTROEMIACEAE				
695	Camellia Japonica	B.R.		
MALVACEAE				
730	Althaea rosea	B.R.		
733	Callirhoë involucrata	B.R.		
734	Sidalcea sp.	B.R.		
762	Hibiscus esculentus	B.R.		
LINEAE				
892	Linum grandiflorum rubrum	B.R.		
GERANIACEAE				
985	Pelargonium zonale		B.R.	
986	Tropaeolum peregrinum	B.R.		
	Tropaeolum majus		B.R.	B.R.
RUTACEAE				
1081	Phellodendron amurense	B.R.		
1096	Limonium Bonduelli	B.R.		
SIMURABACEAE				
1133	Balanites aegyptiaca		B.	
CELASTRINEAE				
1288	Celastrus orbiculata	B.R.		
AMPELIDACEAE				
1358	Vitis rotundifolia	B.R.		
	Vitis vulpina	B.R.		
	Vitis aestivalis		B.R.	
	Vitis aestivalis (Pigeon grape) ..			B.R.
1364	Parthenocissus quinquefolia	B.R.		

N ^o —	HIPPOCASTANACEAE	Inactif —	Aspécif. —	Spécif. —
1491	<i>Aesculus hippocastanum</i>	B.R.		

ACERACEAE

1493	<i>Acer macrophyllum</i>	B.R.		
------	--------------------------------	------	--	--

ROSACEAE

2019	<i>Prunus americana</i>		B.R.	
	<i>Prunus laurocerasus</i>	Co.		
	<i>Prunus spinosa</i>	Co.		
	<i>Prunus avium</i>	B.R.		
	<i>Prunus cerasifera</i>	B.R.		
	<i>Prunus mahaleb</i>	B.R.		
2025	<i>Filipendula Ulmaria</i> Maxim.	Co.		
	<i>Filipendula vulgaris</i>	Co.		
	<i>Spiraea filipendula</i> L.	Co.		
	<i>Spiraea Ulmaria</i>	Co.		
2026	<i>Neillia bracteata</i> Beauv.	Co.		
2028	<i>Exochorda grandiflora</i> Lindl.	Co.		
2031	<i>Rhodotypos kerrioides</i>	Co.		
2042	<i>Rubus</i> sp.	Co.		
2051	<i>Geum montanum</i>	Co.		
	<i>Geum urbanum</i>	Co.		
	<i>Geum rivale</i>	Co.		
2055	<i>Potentilla warrensis</i>	B.R.		
	<i>Potentilla argentea</i>	Co.		
	<i>Potentilla fruticosa</i>	Co.		
	<i>Potentilla recta</i>	Co.		
	<i>Potentilla rupestris</i>	Co.		
	<i>Potentilla tormentilla</i>	Co.		
2058	<i>Alchemilla vulgaris</i>	Co.		
2062	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Co.		
2065	<i>Acaena pinnatifidifolia</i>	Co.		
2066	<i>Sanguisorba serotina</i>	Co.		
	<i>Poterium dictyocarpum</i>	Co.		
2069	<i>Rosa canina</i>	Co.		
	<i>Rosa rubrifolia</i>	Co.		
2072	<i>Cydonia longenaria</i>	Co.		
	<i>Chaenomeles japonica</i>		B.	
2074	<i>Malus domestica</i>	Co.		
	<i>Sorbus fennica</i>	Co.		
2076	<i>Cratoegus azarolus</i> L.	Co.		
	<i>Cratoegus monogyna</i>	Co.		
2077	<i>Cotoneaster horizontalis</i>	Co.		
	<i>Cotoneaster Henryana</i>	Co.		
2078	<i>Eryobotrya Japonica</i> Lindl.	Co.		
2081	<i>Stranvaesia davidiana</i> Dcne.	Co.		

N ^o	SAXIFRAGACEAE	Inactif	Aspécif.	Spécif.
2089	Astilbe rivularis	Co.		
2092	Saxifraga canescens	Co.		
	Saxifraga groenlandica	Co.		
	Saxifraga longifolia	Co.		
	Saxifraga opulifolia	Co.		
	Saxifraga tridactylites	Co.		
2102	Heuchera Americana L.	Co.		
2104	Chrysosplenium oppositifolium ...	Co.		
2117	Deutzia scabra Thunb	Co.		

CRASSULACEAE

2183	Sedum acre	Co.		
	Sedum aizoon	Co.		
	Sedum album	Co.		
	Sedum altissimum	Co.		
	Sedum anopetalum	Co.		
	Sedum rubens	Co.		
	Sedum telephium	Co.		
	Sedum Fabaria var. purpurea Koch	Co.		

MYRTACEAE

2332	Bertolletia excelsa	B.R.		
------	---------------------------	------	--	--

LYTHRACEAE

2496	Cuphea ajacea	Co.		
	Cuphea miniata	B.R.		
2497	Lythrum Salicaria	B.R.		

ONAGRARIEAE

2525	Clarkia elegans	B.R.		
2528	Godetia shamini	B.R.		
2528	Oenothera Lamarkiana	B.R.		

LOASEAE

2571	Mentzelia Lindleyi	B.R.		
------	--------------------------	------	--	--

CUCURBITACEAE

2628	Luffa cylindrica	B.R.		
2633	Cucumis Melo	B.R.		
	Cucumis sp.		B.R.	
2646	Cucurbita maxima	B.R.		

FICOIDAEAE

2716	Mesembryanthemum criniflorum ..	B.R.		
------	---------------------------------	------	--	--

N°	UMBELLIFERAE	Inactif	Aspécif.	Spécif.
2799	<i>Apium graveolens</i>	B.R.		
2806	<i>Carum carvi</i>	B.R.		
	<i>Petroselinum hortense</i>	B.R.		
2814	<i>Pimpinella anisum</i>	B.R.		
2840	<i>Foeniculum vulgare</i>	B.R.		
2906	<i>Anethum graveolens</i>	B.R.		
	<i>Pastinaca sativa</i>	B.R.		
2907	<i>Daucus sativa</i>	B.R.		
RUBIACEAE				
3368	<i>Asperula orientalis</i>	B.R.		
VALERIANEAE				
3377	<i>Valeriana officinalis</i>	B.R.		
DIPSACEAE				
3386	<i>Scabiosa atropurpurea</i>	B.R.		
COMPOSITAE				
3525	<i>Bellis perennis</i>	B.R.		
3544	<i>Aster</i> sp.	B.R.		
3824	<i>Helianthus annuus</i>	B.R.		
	<i>Helianthus</i> sp.	B.R.		
3852	<i>Dahlia</i> sp.	B.R.		
3935	<i>Gaillardia grandiflora</i>	B.R.		
3965	<i>Matricaria parthenoides</i>	B.R.		
3967	<i>Chrysanthemum</i> sp.	B.R.		
4201	<i>Taraxacum officinale</i>	B.R.		
4206	<i>Lactuca sativa</i>	B.R.		
LOBELIACEAE				
4262	<i>Lobelia Erinus</i>	B.R.		
PRIMULACEAE				
4435	<i>Primula Auricula</i>	B.R.		
	<i>Primula obconica</i>	B.R.		
	<i>Primula stellata</i>	B.R.		
	<i>Primula veris</i>	B.R.		
ASCLEPIADEAE				
4742	<i>Asclepias tuberosa</i>	B.R.		
LOGANIACEAE				
4898	<i>Buddleya globosa</i>		B.	
4912	<i>Strychnos Ignatii</i>		Co.	
	<i>Strychnos Nox vomica</i>	Co.		

N ^o —	GENTIANEAE	Inactif —	Aspécif. —	Spécif. —
4955	<i>Gentiana acaulis</i>	B.R.		
4967	<i>Phlox nana compacta</i>	B.R.		
POLEMONIACEAE				
4969	<i>Gilia densiflora hybridus</i>	B.R.		
BORRAGINEAE				
5006	<i>Heliotropum lemoines</i>	B.R.		
5016	<i>Omphalodes amabile</i> (bleu)		B.	
	<i>Omphalodes liniflora</i>		B.	
5051	<i>Myosotis alpestris</i>	B.R.		
5065	<i>Echium</i> sp.	B.R.		
CONVOLVULACEAE				
5077	<i>Ipomoea purpurea</i>	B.R.		
	<i>Quamoclit lobata</i>	B.R.		
SOLANACEAE				
5105	<i>Lycopersicon esculentum</i>	B.R.		
5107	<i>Cyphomandra betaceae</i>		B.	
5142	<i>Datura ferox</i>		E.P. et B.R.	
	<i>Datura gigantea</i>		E.P.	
	<i>Datura laevis</i>		E.P.	
	<i>Datura Leichardtii</i>		E.P.	
	<i>Datura Metel</i>		E.P. et B. et B.R.	
	<i>Datura Stramonium</i>		E.P. et B. et B.R.	
	<i>Datura Wrightii</i>		E.P.	
	<i>Datura discolor</i>		B.R.	
	<i>Datura Ceratocaula</i>		E.P.	
	<i>Datura innoxia</i>		B.R.	
5146	<i>Hyoscyamus niger</i>	B.R.		
5158	<i>Nicotiana acuminata</i>	B.R.		
	<i>Nicotiana affinis</i>	B.R.		
	<i>Nicotiana rustica</i>	B.R.		
	<i>Nicotiana tabacum</i>	B.R.		
5166	<i>Salpiglossis sinuata</i>	B.R.		
SCROPHULARINEAE				
5183	<i>Verbascum phaeniceum</i>	B.R.		
5186	<i>Calceolaria multiflora nana</i>	B.R.		
5194	<i>Linaria marocanna</i>	B.R.		
5215	<i>Penstemon barbatus</i>	B.R.		
	<i>Penstemon glaber</i>	B.R.		
5218	<i>Collinsia bicoïor</i>	B.R.		
5239	<i>Mimulus tigrinus</i>	B.R.		
5282	<i>Digitalis mertonensis</i>	B.R.		
5293	<i>Veronica longifolia</i>	B.R.		

N°		GESNERACEAE	Inactif	Aspécif.	Spécif.
5379	Sinningia speciosa		B.R.		
VERBENACEAE					
5687	Verbena venosa		B.R.		
5712	Clerodendrum trichotomum			B.	
LABIATAE					
5769	Thymus vulgaris		B.R.		
5793	Salvia argentea		B.R.		
	Salvia Haematodes		B.R.		
5802	Nepeta Mussini		B.R.		
5815	Physostegia virginiana		B.R.		
NYCTAGINEAE					
5870	Mirabilis Jalapa		B.R.		
AMARANTACEAE					
5918	Celosia cristata		B.R.		
	Celosia plumosa		B.R.		
5928	Amaranthus caudatus			B.R.	
	Amaranthus tricolor Sunrise			B.R.	
5960	Gomphrena globosa		B.R.		
CHENOPODIACEAE					
5975	Beta vulgaris		B.R.		
5997	Kochia childsi		B.R.		
POLYGONACEAE					
6085	Fagopyrum esculentum		B.R.		
PIPERACEAE					
6141	Piper sp.		B.R.		
LAURINEAE					
6195	Persea americana		B.R.		
EUPHORBIACEAE					
6370	Euphorbia variegata		B.R.		
	Euphorbia exigua		K.		
	Euphorbia pilosa		K.		
6406	Securinega ramiflora Muelb.		Co.		
6460	Croton tiglium			K.	
6562	Ricinus communis			K.	
				B.R.	
				B.	

N°	URTICACEAE	Inactif	Aspécif.	Spécif.
6588	<i>Celtis occidentalis</i>	B.R.		

CUPULIFERAE

6707	<i>Corylus avellana</i>	B.R.
6710	<i>Castanea sativa</i>	B.R.

IRIDEAE

7220	<i>Iris Kaempferi</i>	B.R.
------	-----------------------------	------

AMARYLLIDEAE

7330	<i>Alstromeria aurantiaca</i>	B.R.
------	-------------------------------------	------

LILIACEAE

7362	<i>Asparagus officinalis</i>	B.R.
7390	<i>Kniphofia Uvaria</i>	B.R.
7429	<i>Eremurus</i> sp.	B.R.
7476	<i>Allium cepa</i>	B.R.

COMMELINACEAE

7574	<i>Commelina coelestis</i>	B.
------	----------------------------------	----

GRAMINEAE

7990	<i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i>	B.R.
7995	<i>Coix Lacryma Jobi</i>	B.R.
7998	<i>Eulalia miscanthus</i>	B.R.
7999	<i>Saccharum officinarum</i>	B.R.
8050	<i>Echinocloa frumentacea</i>	B.R.
8055	<i>Setaria italica</i> var. <i>rubrofructa</i>	B.R.
8115	<i>Phleum pratense</i>	B.R.
8254	<i>Festuca elatior</i>	B.R.
8257	<i>Bromus inermis</i>	B.R.

CONIFERAE

8309	<i>Pinus cembroïdes monophylla</i>	B.R.
8315	<i>Abies cephalonica</i>	B.R.
8331	<i>Juniperus chinensis</i>	B.R.
8337	<i>Ginkgo biloba</i>	B.R.
8340	<i>Taxus cuspidata</i>	B.R.

2° RÉSUMÉ DE LA RÉPARTITION DES AGGLUTININES
CHEZ LES LÉGUMINEUSES

Nous donnons la liste des tribus avec seulement quelques indications très générales sur la présence d'espèces agglutinantes. Toutefois, nous précisons les quelques espèces qu'il nous a été donné d'étudier.

PODALYRIEAE. — On ne connaît pas jusqu'à maintenant d'espèce active.

GENISTEAE. — On rencontre les trois catégories possibles, inactives, aspécifiques et spécifiques ; mais aucun genre n'est spécialement cantonné dans l'une des catégories.

TRIFOLIEAE. — Inactives en général, sauf deux espèces aspécifiques :

Medicago sativa (Kob. et Ko.)

Trifolium fragiferum L. (Co.)

Nous avons, en outre, étudié :

Trigonella corniculata L. : inactif

Trifolium campestre Jord : inactif

Medicago tuberculata : hémolytique

LOTEAE. — En général inactives ; sauf deux espèces faiblement spécifiques :

Lotus tetragonolobus (R.)

Lotus purpureus Webb (C. et L.)

et deux espèces aspécifiques :

Lotus corniculatus (Ko.)

Hymenocarpus circinatus Savi (Co.)

GALEGEAE. — Inactives ou aspécifiques.

Une seule espèce spécifique selon Boyd et Reguera (6) :

Amorpha fruticosa

Nous avons étudié :

Indigofera arborescens ; inactif

HEDYSAREAE. — Inactives, sauf deux espèces aspécifiques :

Scorpiurus vermiculata (Ren.)

Ornithopus compressus L. (Co.)

VICIEAE. — On y rencontre des représentants aspécifiques, en nombre nettement supérieur aux inactifs, et quelques espèces spécifiques.

Nous avons étudié :

Vicia serratifolia L. inactif

PHASEOLEAE. — On y rencontre les trois catégories, avec un nombre appréciable d'espèces aspécifiques.

DALBERGIEAE. — Elles sont inactives, mais ont été assez peu explorées.

SOPHOREAE. — Elles sont inactives sauf *Sophora Japonica* trouvé spécifique par Krüpe (24) et inactif par Boyd et Reguera (6).

SWARTZIEAE. — Non encore explorées.

CAESALPINIAE. — Inactives, sauf trois espèces aspécifiques :

Cercis silisquastrum (B. et R.)

Acacia cultriformis (B. et R.)

Bauhinia tomentosa (R.)

MIMOSEAE. — On n'en connaît jusqu'ici point d'active.

Cette revue d'ensemble donne l'impression que la répartition des agglutinines n'épouse étroitement aucune des grandes divisions de la systématique : les Gymnospermes mis à part, et leur étude a été trop peu poussée jusqu'à maintenant pour qu'on s'y arrête, tous les grands groupes ont quelques représentants actifs. Il n'est pas jusqu'aux végétaux inférieurs qui n'obéissent à cette distribution sporadique puisque ELO ESTOLA et MALSTROM (15) ont rencontré sur 139 champignons, 26 % d'espèces actives, et qu'il est commun de trouver des hémagglutinines chez les bactéries et surtout les virus.

Mais à ce caractère apparemment fortuit de leur distribution les agglutinines superposent dans certains cas, à l'intérieur d'unités systématiques plus restreintes, une liaison parfois étroite avec le schéma de la classification. Ainsi, on peut sans difficulté identifier des familles privilégiées du point de vue qui nous intéresse : Solanacées et surtout Légumineuses. Chez ces dernières il est des tribus singulièrement avantagées, telles les Genistées, les Galegées, les Viciées et les Phaseolées, alors qu'au contraire, les Mimosées ne possèdent jusqu'à maintenant aucune espèce active. Si l'on essaye de suivre, toujours chez les Légumineuses, la répartition des agglutinines spécifiques, on constate avec CAZAL et LALAURIE (10) la localisation des agglutinines anti A chez les Viciées et les Phaseolées. Mais cette systématisation ne descend jamais jusqu'au genre lui-même.

Au contraire, chez les Solanées, le genre *Datura* semble bénéficier d'une exclusive presque totale, à laquelle n'échappe aucune des espèces étudiées.

Toutefois, des variations individuelles peuvent survenir qui rendent très probablement compte de quelques contradictions apparentes qu'on peut relever dans les travaux sur la répartition des agglutinines. RENKONEN et THERMAN (42) ont en effet constaté, nous y reviendrons ultérieurement, que certaines semences de *Vicia Cracca* n'ont pas le caractère spécifique habituel à cette espèce, et recèlent une agglutinine polyvalente : ces semences se distinguent des autres par une taille et un nombre chromosomique différents. Il est très vraisemblable que c'est pour une raison du même ordre, qu'avec une espèce donnée, des auteurs obtiennent parfois des résultats divergents.

Ainsi :

Cicer arietinum est inactif pour RENKONEN,
faiblement spécifique pour BOYD et REGUERA ;
Genista sagittalis est inactif pour CAZAL et LALAU-
RIE,
non spécifique pour BOYD et REGUERA ;
Trifolium pratense est actif selon MENDEL,
alors que KOBERT puis RENKONEN le considèrent comme inactif ;
Phaseolus lunatus possède une action spécifique pour BOYD et
REGUERA

et aspécifique pour BOYD puis CAZAL et LALAU-
RIE.

BOYD et REGUERA n'ont pas craint de souligner ce phé-
nomène en donnant pour une même espèce, ou une même
variété, plusieurs résultats obtenus avec des échantillons dif-
férents.

Il convient cependant de réserver à ces variations une
place limitée, car leur amplitude reste très minime en regard
de l'immense majorité des plantes pour lesquelles de telles
discordances ne sont jamais apparues.

Envisagée sous l'angle de la systématique, la présence d'ag-
glutinine apparaît en résumé comme un caractère particulier
à certaines espèces. Si dans quelques cas, plusieurs espèces
d'une même famille (Légumineuses), d'une même tribu (Genis-
tées, Galégées, Viciées, Phaseolées, Crotonées) ou d'un même
genre (*Datura*, *Phaseolus*, *Vicia*, *Lathyrus*), peuvent le parta-
ger, aucun autre point commun ne peut servir à les réunir
toutes.

Cette hétérogénéité dans la répartition des agglutinines
correspond peut-être à une réalité, mais peut-être aussi ne pro-
vient-elle que du point de vue très spécial où nous nous pla-
çons : nous étudions, en effet, un ensemble de substances
connues par leurs propriétés agglutinantes, mais avons-nous
bien le droit de les aligner toutes sur un même plan avant que
leur structure chimique soit entièrement élucidée ? N'est-il
pas anormal de rechercher une genèse commune à des com-
posés hautement toxiques comme la ricine ou la crotine, et à
des substances inoffensives telles que la phasine, à des aggluti-
nines polyvalentes et à des agglutinines spécifiques ?

Il nous semble alors que la conclusion logique si non pru-
dente de cette brève revue doit être formulée à l'inverse de ce
qu'on aurait pu prévoir : l'étude de la répartition systématique
des hémagglutinines végétales ne décèle aucune harmonie
d'ensemble, le caractère hétérogène de leur distribution parmi
les unités systématiques peut être au contraire considéré
comme un argument indirect en faveur de la dissemblance de
leur constitution chimique.

**ETUDE DE LA PHYTOAGGLUTININE
DANS LA PLANTE**

En dehors de la répartition systématique des phytoagglutinines l'aspect essentiellement botanique de leur étude a été envisagé principalement par EISLER et PORTHEIM (13). Ces auteurs allemands se sont adressés au *Ricinus communis*, au *Datura Stramonium* et surtout au *Phaseolus multiflorus*. Après avoir reconnu l'absence d'agglutinine dans les parties végétatives, feuilles, tiges, racines et dans la fleur, ils constatent son apparition, exclusive, dans l'endosperme ou les cotylédons, à partir d'un certain degré de maturation de la graine. Il leur semble que ce comportement est celui d'une substance de réserve : partant de cette hypothèse, ils cherchent à établir, en l'appréciant par ses caractères macroscopiques externes, ce degré de maturation auquel correspond l'apparition de l'agglutinine dans la graine. C'est ainsi qu'ils montrent que les graines du *Phaseolus multiflorus* passent par plusieurs phases successives au cours de leur développement ; au fur et à mesure que la graine grossit de 2 mm. à 15 mm., sa couleur, d'abord vert pâle, devient rose en partie, puis en totalité. Le rose à son tour se modifie par l'adjonction de marbrures bleuâtres : à ce stade final correspondant au maximum de substances de réserve, toutes les graines contiennent de l'hémagglutinine. Les graines prises à des stades antérieurs en sont dépourvues, sauf, parfois, quelques graines au stade entièrement rose. Par le même procédé d'observation macroscopique des graines (taille, couleur et aspect), EISLER et PORTHEIM aboutissent pour le *Ricinus communis* et pour le *Datura Stramonium* à la même conclusion : l'apparition des agglutinines dans les graines des trois végétaux considérés n'a lieu que lorsqu'elles ont atteint une certaine taille et accumulé certaines substances de réserve. Allant plus loin, ces chercheurs ont voulu établir si les modifications subies par les réserves au cours de la maturation n'étaient pas à l'origine de la synthèse des agglutinines. Dans ce but, ils s'efforcent d'accélérer dans la graine isolée les modifications qui s'accomplissent au cours de la maturation ; des essais pratiqués aux dépens de graines aux différents stades, à des températures allant de la température ordinaire à 50°, les amènent à la constatation suivante : chez le *Phaseolus multiflorus*, les graines encore vertes ne peuvent acquérir « in vitro » le pouvoir agglutinant qui leur manque ; les graines au stade rose, au contraire, sont susceptibles, quand elles en sont dépourvues,

de synthétiser l'agglutinine par exposition à des températures allant de 36 à 50°.

Les autres auteurs sont unanimes à s'adresser aux semences comme source d'agglutinine, et peu d'entre eux se sont préoccupés des autres parties de la plante : hormis l'étude d'EISLER et PORTHEIM que nous venons d'évoquer, il n'est guère que CAZAL et LALAUURIE (10) qui signalent la présence pour *Vicia Cracca* d'agglutinine en dehors des semences, dans les feuilles surtout et accessoirement dans les tiges et les sommets.

Nous nous sommes attaché à essayer d'élucider, au moins en partie, le sort des agglutinines dans la plante ; après quelques essais sur des exemplaires de *Vicia sepium* récoltés dans la nature, nous avons étudié l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* pour une variété mise en culture, et choisie comme nous le verrons plus loin. Il nous paraît normal d'exposer ce groupe d'expériences dans l'ordre où nous les avons accomplies, car cette façon de faire nous permettra de rapporter en même temps les hypothèses successives qui se sont présentées à nous.

Les organes dans lesquels l'agglutinine était recherchée ont été prélevés et mis aussitôt à 37° pour accélérer leur dessiccation. Après 48 heures, au moins, ils subissent une pulvérisation : la poudre obtenue est mise à digérer pendant 2 heures à 37° dans dix fois son poids d'eau salée à 9°/°° : après centrifugation, le liquide clair est éprouvé en présence de globules ORh + lavés (1 goutte de suspension globulaire à 5 % pour 0 cm³ 4 de liquide) et l'agglutination lue après 18 heures de séjour à température ordinaire.

DÉPISTAGE DE L'AGGLUTININE DANS LES DIVERS ORGANES
DE VICIA SEPIUM RÉCOLTÉE DANS LA NATURE

Nous présentons d'abord les résultats bruts :

N°	STADE DE DEVELOPPEMENT	NODOSITES	RACINE	TIGE	FOLIOLES	FLEUR	VALVES du fruit	GRAINES
1	Avant floraison. Aucune corolle apparente				+			
2	—		o	o	o			
3	—				+			
4	—				+			
5	Floraison à son début. Corolles visibles mais non ouvertes			o	o			
6	Début d'anthèse. Première fleur épanouie		o	o	o			
7	—				+			
8	Floraison en cours. Fleurs de la base épanouies				o			
9	—		o		+			
10	—				o			
11	—		o	o	+			
12	Pleine floraison. Aucune gousse n'est encore visible				o			
13	Pleine floraison. Gousses vertes à l'étage floral inférieur.		o	o	+	o		
14	—	o	o	o	+	o		
15	—				+			
16	—				o			
17	Pleine floraison. 2 étages de gousses		o	o	o	o	o	o
18	3 étages de gousses vertes ...				+			o
19	5 étages de gousses			o	o	o	o	+

Ces résultats montrent que pour l'espèce considérée, l'agglutinine se rencontre essentiellement dans les feuilles et dans les graines mûres. Mais cette présence n'est pas constante, et certains individus possèdent des feuilles apparemment dépourvues du principe agglutinant. L'existence dans certaines plantes d'agglutinines spécifiques, reconnues par RENKONEN (40) et tout particulièrement dans le genre *Vicia*, d'une agglutinine anti A₁, permet d'envisager de façon purement hypothétique, que les individus de *Vicia sepium* dépourvus d'agglutinine anti O peuvent cependant être porteurs d'agglutinine anti A₁.

Une telle hypothèse trouve d'ailleurs sa justification dans un travail de RENKONEN et THERMAN (42) qui nous est parvenu quand cette expérience était en cours : les auteurs nordiques ont en effet constaté, en étudiant des semences de *Vicia Cracca* d'origines diverses, que l'activité de l'agglutinine n'avait pas toujours le caractère de spécificité habituellement rencontré dans cette espèce. Les représentants à agglutinine non spécifique présentaient des nombres chromosomiques différents de ceux des autres (12 ou 24 au lieu de 14, 27 ou 28) et le poids moyen des graines variait sensiblement.

Pour cette raison, nous avons recherché le pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules A, dans les essais n^{os} 8, 12 et 16 où les plantes en expérience paraissaient dépourvues d'agglutinines anti O ; cette recherche est restée négative. On doit donc en conclure que certains individus pris au hasard dans une espèce comme *Vicia sepium* sont dépourvus de pouvoir agglutinant contrairement aux autres envisagés au même stade.

Mais pour un individu donné, reconnu porteur d'agglutinine, il n'est pas certain que toutes les feuilles en soient également riches : nous avons recherché l'agglutinine dans les feuilles de représentants de l'espèce *Vicia sepium* à divers stades, étage, par étage.

RÉPARTITION DE L'AGGLUTININE DANS LES ÉTAGES FOLIAIRES CHEZ *VICIA SEPIUM*

ÉTAGES FOLIAIRES numérotés en partant du sommet	DEBUT FLORAISON	DEBUT FLORAISON	UNE HAMPE FLORALE non ouverte	UNE HAMPE FLORALE non ouverte	PAS DE HAMPE FLORALE	3 ÉTAGES DE GOUSSES mûres	GOUSSES TOMBÉS	PAS DE FRUCTIFIC. apparente
1	+	+	+	+	+	+	o	o
2	+	+	+	+	+	+gousse	+	o
3	+	+	+	+	+	+gousse	+	o
4	o	o	o	+	+	+gousse	+	+
5	o	o	+	+	abortif	+	+	o
6	o	o	fané	+	abortif	+	+	
7			+	tombé		o	o	
8			+	tombé				
9			+	+				
10			+					
11			fané					

Le tableau des résultats fait apparaître, à côté de différences individuelles, précédemment rapportées, une inégalité de répartition parmi les feuilles que la recherche globale ne pouvait déceler.

L'ensemble de ces constatations faites sur les plantes récoltées au hasard nous a conduit à procéder à une étude systématique de l'agglutinine dans un végétal en culture suivi pas à pas au cours de son développement. Pour n'utiliser si possible qu'un seul et même matériel végétal dans les parties botanique, chimique et sérologique de ce travail, nous nous sommes adressé à une plante courante, de culture facile, fournissant des semences abondantes : *Phaseolus vulgaris* L. Des raisons de moindre encombrement nous ont amené à préférer une variété naine. Les ressources locales mettaient à notre disposition les 8 variétés suivantes :

NOIR DE BELGIQUE

COCO

SAXA

NOIR DE DEUIL

DAUPHIN

FIN DE BAGNOL

MERVEILLE DE PARIS

TRIOMPHE DE FARCY

Pour choisir l'une d'elles, nous les avons éprouvées quant à leur teneur en agglutinine : un échantillon de chaque catégorie de semences est pulvérisé, pesé et extrait par 10 fois son poids d'eau physiologique. Les extraits ainsi obtenus sont titrés par rapport à une même suspension globulaire. Dans ces conditions les 5 dernières variétés se sont montrées sensiblement équivalentes ; le Noir de Belgique et plus encore le Coco apparaissent légèrement moins actifs ; le Saxa, au contraire, manifestait une activité légèrement supérieure : c'est donc cette dernière variété que nous avons retenue ; et c'est ce *Phaseolus vulgaris* L. var. Saxa, provenant des établissements TÉSIER (Valence) qui nous a servi tant dans l'étude botanique que comme source d'agglutinine pour les investigations sérologiques et chimiques.

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DE L'AGGLUTININE
DANS LES ORGANES DU *PHASEOLUS VULGARIS* L. VAR. SAXA

Localisation dans la graine

La présence d'agglutinine dans la poudre de semences totales ne permet pas de savoir quelle partie précise de la graine en est le lieu d'accumulation : en décortiquant des graines, on peut, sans trop de difficultés, préparer une poudre puis un extrait des téguments. Cet extrait se révèle inactif à l'encontre de la poudre totale. C'est donc l'embryon lui-même avec ses cotylédons qui constitue le siège de l'agglutinine, tandis que les téguments en sont dépourvus.

Etude systématique au cours du développement en culture

Nous avons choisi parmi les graines de la variété Saxa une trentaine de taille sensiblement constante. Ces graines sont semées isolément en raie en pleine terre.

Nous attendons alors la sortie des plantules et dès ce moment arrachons à intervalles réguliers des échantillons correspondant aux stades successifs du développement et dont les organes, après séparation sont soumis à une recherche d'agglutinine.

Nous donnons d'abord le résultat détaillé des recherches de l'agglutinine dans les organes des 10 premiers exemplaires prélevés, avec description en quelques mots de l'état de la plantule. L'absence d'agglutinine est indiquée par le signe —, sa présence par un ou plusieurs signes +, en fonction de l'intensité de l'agglutination.

1. Cotylédons encore coiffés par leur tégument, légèrement décollés l'un de l'autre :
Racine —
Hypocotyle —
Cotylédons ++
Téguments des cotylédons —
Gemmule et premières feuilles —
2. Cotylédons libres, disjoints. Les deux premières feuilles sont encore imbriquées :
Racine —
Hypocotyle —
Cotylédons ++
Gemmule et premières feuilles ++
3. Cotylédons écartés. Premières feuilles dressées, encore imbriquées. L'hypocotyle jusque-là recourbé est droit :
Racine —
Hypocotyle —
Cotylédons +++
Gemmule et premières feuilles ++
4. Cotylédons écartés. Les premières feuilles commencent à s'écarter :
Racine —
Hypocotyle —
Cotylédons ++
Gemmule et premières feuilles +
5. Cotylédons encore persistants. Les deux premières feuilles sont étalées :

- | | |
|--|----|
| Racine | — |
| Hypocotyle | — |
| Cotylédons | ++ |
| Premières feuilles et bourgeon terminal | + |
6. Cotylédons en voie de dessiccation, enroulés sur eux-mêmes.
Premières feuilles étalées :
- | | |
|---------------------------------|-----|
| Racine | — |
| Hypocotyle | — |
| Cotylédons | +++ |
| Premières feuilles | + |
| Tige et bourgeon terminal | — |
7. Les cotylédons sont tombés. Seules les premières feuilles sont développées :
- | | |
|---------------------------------|---|
| Racine | — |
| Hypocotyle | — |
| Premières feuilles | — |
| Tige et bourgeon terminal | — |
8. Début de développement des deuxième feuilles. L'une est ébauchée, l'autre est encore repliée :
- | | |
|------------------|---|
| Racine | — |
| Tige | — |
| Feuilles I | — |
| Feuille II | — |
9. L'une des feuilles II est épanouie ; l'autre ébauchée :
- | | |
|------------------|---|
| Racine | — |
| Tige | — |
| Feuilles I | — |
| Feuille II | — |
10. Feuilles II développées. Le bourgeon terminal est accompagné de feuilles ébauchées :
- | | |
|--|---|
| Racine | — |
| Tige jusqu'aux premières feuilles | — |
| Feuilles I | — |
| Feuille II | — |
| Tige entre les deux étages de feuilles | — |
| Bourgeon et feuilles terminaux | — |

L'étude des échantillons ultérieurs jusqu'à la fructification complète ne peut pratiquement pas être détaillée de la même façon, car avec le développement des jeunes plantes surviennent des ramifications de plus en plus nombreuses : nous avons chaque fois recueilli chaque feuille isolément, chaque groupe de fleurs ou de fruits, tige et racine constituant aussi des fragments étudiés à part. Cette façon de pro-

céder nous a amené jusqu'à diviser une même plante en 17 lots différents. On conçoit dans ces conditions que le rapport miautieux de cette expérimentation comporterait quelque complexité et on comprendra que nous y ayons renoncé. Rien n'est plus aisé, au contraire, que de formuler la conclusion dégagée de ces observations :

L'agglutinine, présente dans les cotylédons et dans les premières feuilles, disparaît de ces dernières avec la chute des cotylédons. On ne la voit plus réapparaître dans l'appareil foliaire, et il faut attendre, à la fructification, la maturation des graines pour retrouver à leur niveau une quantité d'agglutinine décelable dans les conditions où nous avons opéré.

Nous pouvons donc admettre qu'à l'opposé des *Vicia* étudiées précédemment, le *Phaseolus vulgaris* L. var. *Saxa* a des feuilles dépourvues d'agglutinine. L'agglutinine n'existe dans la plante que dans les réserves de la graine mûre et transitoirement dans les feuilles primordiales où elle subsiste à peu près autant que les cotylédons sur la jeune plante. Ce comportement particulier du *Phaseolus vulgaris* incitait à envisager plus en détail l'agglutinine de la jeune plante : c'est ce que nous avons fait dans la suite.

Etude des relations entre les cotylédons et les feuilles primordiales (quant à l'agglutinine)

La connaissance de ce qui précède, et en particulier :

d'une part : l'apparition de l'agglutinine seulement dans les graines mûres ;

d'autre part : son existence passagère dans les feuilles primordiales avec disparition liée à la chute des cotylédons suggérait une parenté entre l'agglutinine des cotylédons et l'agglutinine des feuilles primordiales, celle-ci n'étant que la transposition de celle-là. C'est cette hypothèse que nous avons cherché à vérifier de la façon suivante :

Le 28 août, nous semons, au laboratoire, dans des caisses de terreau, des graines de *Phaseolus vulgaris* var. *Saxa*, réparties en trois lots. Le terreau est arrosé chaque jour avec de l'eau du robinet.

Le premier lot sert de témoin : du 6 au 8 septembre, les feuilles primordiales des jeunes plantes sont prélevées et mises à sécher.

Le deuxième lot subit, dès que la chose est matériellement possible, une section des cotylédons au niveau de leur insertion. Cette amputation s'étale en fonction de l'état du développement des plantules, du 3 au 7 septembre. Les jeunes plantes ainsi privées des réserves normales continuent leur dévelop-

pement grâce à l'activité synthétique des premières feuilles : celles-ci sont à leur tour sectionnées, du 7 au 9 septembre et abandonnées à la dessiccation.

Le troisième lot, enfin, va conserver ses cotylédons, mais nous profitons du plus petit espace apparu entre eux pour saisir et écarter les feuilles primordiales et pour les sectionner au niveau du pétiole sans altérer le sommet de la tige : ces feuilles primordiales récoltées du 3 au 9 septembre sont conservées. Les plantes, encore munies de leurs cotylédons, mais dépourvues de leurs premières feuilles, poursuivent leur croissance, et bientôt commence à s'épanouir le premier étage des feuilles définitives : nous les sectionnons avant que les cotylédons ne soient épuisés, du 7 au 12 septembre.

Nous avions de la sorte, à côté de feuilles primordiales prélevées sur des plantes témoins encore pourvues de leurs cotylédons, des feuilles primordiales prélevées après développement sur des plantes privées de cotylédons, et enfin, des feuilles de l'étage immédiatement supérieur aux feuilles primordiales, récoltées sur des plantes débarrassées très tôt de ces feuilles primordiales et conservant encore leurs cotylédons.

Les échantillons ainsi récoltés sont après dessiccation pulvérisés et extraits en vue de la recherche de l'agglutinine : dans ces conditions, nous avons constaté :

- la présence d'agglutinine dans les feuilles primordiales du lot témoin ;
- son absence dans celles du deuxième lot, aux cotylédons sectionnés ;
- sa présence dans les premières feuilles définitives du troisième lot, aux cotylédons conservés, mais aux feuilles primordiales supprimées.

Il nous semble qu'on peut raisonnablement en déduire que l'agglutinine observée dans les feuilles primordiales provient des cotylédons, puisqu'elle disparaît avec eux, et passe au contraire à l'étage supérieur où elle manque normalement, quand on supprime les feuilles primordiales. L'agglutinine, dont EISLER et PÖRTHEIM (13) soulignent la parenté avec les matières de réserve, paraît être, dans le cas du *Phaseolus vulgaris* var. *Saxa*, une substance accumulée dans les cotylédons, qui migre dans les feuilles primordiales pour y être métabolisée.

L'étude du *Phaseolus vulgaris* ne nous a pas fourni l'occasion de chercher à préciser le lieu de formation de l'agglutinine, mais la présence, dans d'autres espèces, d'agglutinine au niveau des feuilles, en l'absence d'organes de réserves, laisse supposer que c'est là son lieu de synthèse, et si le *Phaseolus* ne paraît point en accord avec cette hypothèse, c'est peut-être

que l'agglutinine synthétisée dans la feuille est aussitôt entraînée dans les processus métaboliques, sans accumulation locale ; seuls les cotylédons de la graine en maturation seraient susceptibles de la mettre en réserve, pour le profit ultérieur de la jeune plante. Une telle hypothèse trouve sa justification partielle dans les travaux d'EISLER et PORTHEIM (13) qui remarquent que l'agglutinine, substance de réserve, apparue dans les tissus nourriciers de la graine, et absente dans l'appareil végétatif des plantes qu'ils ont étudiées, peut, dans certains cas, être décelée dans les parties végétatives, quand il s'agit d'organes de réserves.

Ainsi, après MARCUSSEN et BEGUN (33), qui signalent une agglutinine dans les tubercules de pommes de terre, ils décèlent l'activité agglutinante de parties végétatives normalement inactives : l'hypocotyle et les racines de *Phaseolus multiflorus*, quand ils se tubérisent. De même, l'appareil végétatif des *Euphorbia* peut contenir de l'agglutinine puisqu'il est parcouru par les laticifères que les auteurs allemands considèrent comme un organe d'accumulation des réserves.

Si l'on s'en tient aux résultats d'ensemble, on peut donc conclure que dans les quelques cas où leur évolution dans la plante a été envisagée, les agglutinines végétales ont un comportement analogue à celui qu'il est commun d'observer pour les substances de réserve. Notons malgré tout que c'est l'absence de tout autre rôle précis et évident qui nous a conduit à cette conclusion.

Mais l'on peut discuter l'origine véritable de ces agglutinines : nos propres constatations et celles de CAZAL et LALAU-RIE (10) permettent de considérer la feuille comme un lieu d'accumulation momentanée ; si l'on réfléchit qu'au même moment tout le reste du végétal est dépourvu d'agglutinine, on incline à penser que le parenchyme foliaire, déjà connu pour son rôle anabolisant à l'égard de substances très diverses, peut fort bien réaliser aussi la synthèse des agglutinines. A l'opposé, les résultats d'EISLER et PORTHEIM (13), résumés précédemment, tendent à montrer, pour des espèces différentes, la possibilité que présentent les graines à partir d'un certain stade, de synthétiser l'agglutinine aux dépens de leur propre contenu, sans aucun apport du reste de la plante. En réalité, les deux mécanismes ne sont nullement contradictoires, puisque d'autres synthèses, comme la synthèse protidique, peuvent s'accomplir à ces divers niveaux, foliaire et seminal, et c'est cette double éventualité que nous admettons en considérant que les agglutinines telles qu'elles ont été étudiées chez les Papilionacées peuvent, selon les espèces, prendre naissance dans les feuilles ou dans les graines et s'y accumuler.

ETUDE
DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICOCIMIQUES
DE L'AGGLUTININE DU PHASEOLUS VULGARIS

La nature chimique des phytoagglutinines constitue un problème avec lequel on prend contact dès l'instant qu'on s'intéresse à leur étude à quelque point de vue que ce soit. En effet, le premier acte expérimental à accomplir est de les extraire des semences qui les contiennent. Si une extraction brute en milieu aqueux fournit sans difficulté un matériel en général suffisant, elle n'offre que peu de ressources aux spéculations quant à l'identité du principe actif. Mais si l'on considère l'ensemble des procédés proposés et mis en œuvre par les différents auteurs pour aboutir à des préparations purifiées et concentrées, on perçoit divers aspects des propriétés physicochimiques des phytoagglutinines, propres à apporter quelque précision sur leur nature. En outre, quelques auteurs ont ajouté à leur travail de purification le résultat d'analyses directes ou indirectes susceptibles d'éclaircir le problème.

Le procédé le plus ancien et le plus employé d'extraction des agglutinines est la macération dans l'eau salée à 9°/°° : employée initialement à basse température par LANDSTEINER et RAUBITSCHKE (26), puis par WIENHAUS (48), elle est ensuite pratiquée à 37° par les auteurs modernes RENKONEN (40), KOU-LUMIES (22), CAZAL et LALAUZIE (10), KRUPPE (24), tandis que BOYD et REGUERA (6) se contentent de la température ordinaire. Nous l'avons nous-même utilisée à 37° et à 70°. On obtient par cette technique une solution assez active, mais il s'en faut qu'elle épuise la totalité du principe actif : WIENHAUS (48) a montré que la solution isotonique servant à l'extraction peut être remplacée par une solution de ClNa à 11 % avec un égal rendement, quitte à diluer après coup pour retrouver l'isotonie, et qu'on pouvait, en outre, reprendre par une solution à 11 % une poudre de *Phaseolus* déjà traitée par la solution isotonique, et en extraire à nouveau de l'agglutinine. L'extraction par l'eau distillée au contraire donne un produit moins actif.

Nous en concluons que l'agglutinine est soluble dans l'eau salée à 9°/°° dans des limites de température très larges, et dans l'eau salée à 11 %.

L'action de l'eau distillée ajoutée à l'extrait en milieu isotonique a été envisagée par WIENHAUS (48) qui observe après addition de plusieurs volumes la formation d'un abondant précipité, sans pour cela que l'agglutinine se sépare dans l'une ou l'autre phase : l'auteur en retrouve en effet autant

dans le précipité que dans le liquide surnageant et conclut qu'il s'agit d'une albumine active par elle-même, c'est elle qui est restée en solution, et d'une globuline active elle aussi, c'est elle qui a précipité.

Les solvants organiques ont une action variable sur les extraits aqueux : ils sont en général à la base des méthodes qui permettent d'aboutir à des préparations purifiées : nous exposerons ces méthodes un peu plus loin. Il nous semble préférable présentement de rapprocher les comportements divers de l'agglutinine en présence de ces solvants : ils varient avec le solvant et avec la dose. Ils varient parfois aussi avec les auteurs, mais ceci ne provient peut-être que du caractère très divers des matériaux employés.

Les conséquences de l'addition d'alcool aux extraits obtenus dans l'eau salée sont fonction du titre et de la quantité employés : après LANDSTEINER et RAUBITSCHKE, WIENHAUS (48) signale la précipitation de la « PHASINE » de sa solution aqueuse par un volume égal d'alcool à 95°. BOURDILLON (4), en opérant sur un extrait aqueux de concentration équivalente, amené à pH 9, ne retient après précipitation par la même quantité d'alcool que le liquide surnageant, pour des purifications ultérieures. Au contraire, à une dilution plus grande, l'alcool ne précipite que des substances sans intérêt, « plutôt inactives », dit RENKONEN (41), et c'est dans le liquide surnageant que cet auteur, puis KOULUMIES (23), retrouvent une agglutinine partiellement purifiée. BOYD et REGUERA (6) signalent sans précisions numériques qu'on peut extraire des phytoagglutinines par des mélanges d'eau et d'alcool, d'où elles peuvent être précipitées à basse température ; ils reprennent, par ailleurs, pour isoler le principe actif du haricot de Lima, la technique mise au point par SUMMER et GRAHAM (47), pour séparer la concanavaleine A de *Canavalia ensiformis* : la poudre de graines est extraite puis lavée à l'alcool à 30 % qui entraîne la concanavaleine B, avant d'être soumise à un épuisement par une solution saline dans laquelle passent la canavaleine et la concanavaleine A.

D'autres solvants ont été mis en présence des extraits aqueux étudiés par les divers auteurs : l'acétone, selon KOULUMIES (23) et RENKONEN (41), précipite les agglutinines de *Vicia Cracca* et de *Cytisus sessilifolius*. BOURDILLON (4) l'utilise à froid pour laver ses préparations purifiées de haricot ; il signale, en outre, la possibilité de dissoudre l'agglutinine végétale dans tout autre solvant organique : la technique de purification qu'il propose met ainsi en jeu comme solvants successifs l'alcool méthylique puis l'acétone contenant 10 % d'alcool

méthyllique ; dans un procédé différent il emploie l'alcool isopropylique.

Toutefois, les auteurs nordiques, de leur côté, usent du chloroforme en agitation avec la solution aqueuse d'agglutinine, non pas pour l'entraîner, mais simplement pour en éliminer certaines impuretés, et se servent d'éther pour laver sans le dissoudre leur produit purifié.

Les procédés de purification ou d'extraction tirant profit de ces diverses propriétés sont les suivants ; nous les exposons succinctement, en précisant avec le nom des auteurs le matériel végétal mis en jeu.

WIENHAUS (48) pour *Phaseolus* sp. :

A partir d'un extrait en milieu isotonique, le principe actif est précipité par mélange avec un égal volume d'alcool à 96° : après 12 heures, il est séparé et redissous dans l'eau salée isotonique et reprécipité dans les mêmes conditions. Après dessiccation le précipité se présente en une poudre blanche qui constitue la « Phasine » de WIENHAUS.

RENKONEN (41) pour *Vicia cracca* et KOULUMIES (23) pour *Cytisus sessilifolius* :

L'extrait aqueux est additionné d'un quart de son volume d'alcool à 95°. Après 2 heures à température ordinaire, on centrifuge pour ne conserver que le liquide surnageant ; celui-ci est mélangé à deux volumes d'acétone. Après 30' on centrifuge pour recueillir le précipité. On le dissout alors dans un volume d'eau salée isotonique représentant le volume initial d'extrait aqueux et on ajoute un demi-volume de chloroforme : après une heure d'agitation, on centrifuge, ce qui permet d'obtenir trois couches superposées, l'une chloroformique en bas, l'autre constituée par un précipité au milieu, et la troisième aqueuse en haut. C'est cette dernière que l'on recueille et qu'on dilue à son tour dans 2 volumes d'acétone : comme précédemment, le précipité est recueilli, mais on le redissout cette fois dans un volume d'eau salée inférieur au précédent. Ce nouvel extrait ainsi purifié et plus concentré que l'extrait initial subit à son tour l'action du chloroforme puis de l'acétone et l'on poursuit la chaîne des opérations en réduisant chaque fois le volume d'eau salée mis en jeu. KOULUMIES termine, en outre, par une dernière précipitation à l'acétone suivie d'un lavage à l'éther et d'une dessiccation.

BOYD et REGUERA (6) appliquent au haricot de Lima la technique de SUMMER et GRAHAM (47) pour la concaavaline A : la poudre de semences d'abord lavée à l'alcool à 30 % qui entraîne la concaavaline B est reprise par ClNa 2 %. L'extrait salin ainsi obtenu est mélangé à du toluène, et dialysé contre

une solution 0,001 N d'acide acétique, jusqu'à précipitation des globulines : on sépare le précipité et on le lave à l'eau et au ClNa à 10 %. Après centrifugation poussée le précipité est trituré avec 100 mg. de saccharose (pour 125 cm³ de précipité) et 60 cm³ de solution neutre de phosphates (PO₄H₂K 4,25 % et PO₄HK₂ 6,8 %) : la solution obtenue est traitée par un mélange de solution neutre de phosphates, d'alcool à 30 % et de ClNa solide : après 24 heures de contact on filtre et on dialyse la solution pour éliminer le sel ; les cristaux qui apparaissent sont recueillis, lavés et séchés.

BOURDILLON (4) comparant l'hémoagglutinine du virus de l'Influenza à celle du haricot propose pour ce dernier deux techniques :

La première opère aux dépens d'un extrait aqueux primitif : cet extrait est alcalinisé avec de la soude normale jusqu'à pH 9,0. On ajoute alors un volume d'alcool éthylique ; le précipité qui se forme est séparé et rejeté. Le liquide surnageant est additionné d'acide acétique en quantité suffisante pour neutraliser une fois et demie la soude précédemment utilisée. Le précipité apparu dans ces conditions est séparé et traité par un ou deux volumes d'alcool isopropylique : l'agglutinine passe en solution, alors qu'il subsiste un résidu insoluble important. La solution isopropylique est évaporée et laisse déposer l'agglutinine qu'on peut redissoudre « dans n'importe quel solvant organique ».

L'auteur semble avoir abandonné cette méthode au profit de la suivante, qui soumet directement la poudre de semences à l'action d'un solvant organique, sans passage préalable par un extrait aqueux ; la poudre est traitée par quelques volumes d'alcool méthylique. Cet extrait méthylique est évaporé à sec, le résidu est lavé à l'acétone à froid, puis repris par un mélange d'acétone (9 parties) et d'alcool méthylique (1 partie). On évapore la solution ainsi obtenue et on en reprend le résidu par un peu d'alcool méthylique. L'addition de 4 volumes d'éther à ce dernier soluté fait apparaître un précipité qu'on élimine. La liqueur surnageante contient l'agglutinine qu'on peut récupérer après évaporation, par des solvants organiques, sauf l'acétone qui ne la dissout qu'à chaud. L'eau alcaline permet d'en faire une suspension qui précipite à la neutralisation.

À côté de l'alcool et des autres solvants organiques, la purification des agglutinines des légumineuses a été obtenue avec d'autres substances : depuis longtemps des chercheurs se sont adressés aux propriétés précipitantes de certains sels minéraux en solution concentrée. C'est le procédé du relargage

bien connu et couramment utilisé dans l'étude des protéines animales et végétales.

LANDSTEINER et RAUBITSCHKE (26) signalent la précipitation par le sulfate d'ammonium des agglutinines de quelques Papilionacées et en particulier du haricot. SCHNEIDER (43) l'utilise à saturation au cours de la préparation de l'agglutinine purifiée du *Phaseolus multiflorus* Willd., puis d'une solution active issue de dialyses successives, sépare une fraction inactive en saturant le milieu en sulfate de magnésie. Le précipité formé est alors dépourvu d'agglutinine qui reste en solution. Par ce procédé, dont nous exposerons plus loin les détails, l'auteur aboutit à la conclusion que l'agglutinine en question est une protéose.

Au même titre que le relargage par les substances salines, il convient de citer maintenant le comportement des agglutinines en solution quand on vient à les diluer par de l'eau distillée, ou à dialyser les solutions salines pour les épurer de leurs électrolytes. Dans l'étude des protéines animales, les travaux de SANDOR ont établi l'intérêt de ce procédé qui montrait la possibilité par dilution à pH déterminés, de séparer euglobulines et pseudoglobulines.

Nous avons rappelé plus haut les résultats de WIENHAUS (48), obtenus par simple dilution de l'agglutinine sous forme d'extrait végétal brut, dans plusieurs volumes d'eau distillée.

La relation détaillée du procédé de SCHNEIDER (43), pour isoler l'agglutinine du *Phaseolus multiflorus*, va nous apporter quelques précisions sur son sort au cours de dialyses successives.

Une partie de poudre de semences préalablement dégraissée par le benzène est mise à digérer dans cinq parties d'eau salée à 2 %, pendant deux heures à 60°. Après une nuit de repos au frais, le mélange est filtré. La liqueur ainsi obtenue est dialysée pendant 36 heures contre de l'eau pure : il se forme un précipité qui malheureusement se dénature au cours de sa dessiccation et dont les 2/3 restent insolubles. L'auteur n'y fait plus allusion dans la suite. La solution au contraire est à son tour dialysée contre de l'eau pendant 3 jours : cette dialyse s'accompagne d'une acidification légère du milieu que l'on neutralise. Il apparaît au cours de cette deuxième dialyse un précipité II que l'on sépare et dessèche : il est alors possible de le redissoudre en grande partie (85 %). La liqueur au sein de laquelle est apparu ce précipité II et qui subsiste après sa filtration, baptisée solution B1, est elle aussi dialysée pendant plusieurs jours : elle abandonne encore dans ces conditions un petit précipité III, cependant que le liquide surnageant B2

séparé est saturé de Sulfate d'Ammonium. Cette saturation saline détermine la précipitation d'une fraction IV au sein d'une solution B3. Cette solution B3 est épurée de son sel par dialyse et se montre totalement dépourvue d'activité agglutinante. Le précipité IV est redissous et sa solution additionnée de Sulfate de Magnésie jusqu'à saturation avec acidification légère par l'acide acétique ; il se forme un léger précipité V qu'on sépare de sa solution mère Cl. Cette dernière, après une dialyse destinée à en faire disparaître le Sulfate de Magnésie, est évaporée ; le résidu constitue la protéose dont SCHNEIDER isole ainsi 1 gr. à partir d'1 kg. de semences.

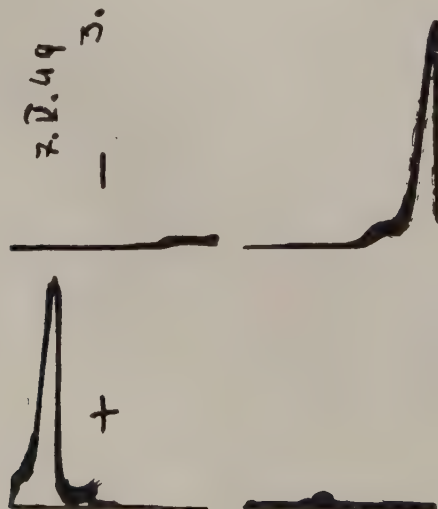
Dans les fractions ainsi séparées, l'auteur relève la répartition suivante du pouvoir agglutinant :

Globulines : fraction I et II (Phaseoline) et fraction III (Phaseoline). Activité faible, la plus efficace étant la fraction II.

Albumine : fraction V. Activité encore plus faible que celle des globulines.

Protéose : fraction Cl. Activité maxima.

SCHNEIDER conclut à la localisation de l'agglutinine dans les protéoses, l'activité, d'ailleurs, restreinte, des autres fractions provenant d'une simple adsorption de la substance active sur les précipités inactifs.



Enfin, avant de décrire les résultats obtenus par RENKONEN, (41), en appliquant l'électrophorèse à un extrait purifié de Phaseolus, nous rappellerons les quelques propriétés physicochimiques qu'il y met en évidence ; le produit purifié en question

contient 30 % d'hydrates de carbone, 9 à 10 % d'azote. Il donne lieu à la formation de biuret d'une façon très notable. Son minimum de solubilité dans l'eau se situe entre les pH 2 et 3; précipitable par l'acide tannique, il ne l'est pas par l'acide trichloracétique à 10 %. RENKONEN retrouve des résultats analogues avec *Vicia Cracca*.

Dans les deux cas, l'électrophorèse a fourni à l'auteur nordique des diagrammes superposables; nous donnons avec les seules indications qui l'accompagnent, la reproduction du diagramme correspondant au *Phaseolus*, qui montre la pureté du produit obtenu.

Sans aller jusqu'à penser que les agglutinines des Papilionacées sont toutes exactement superposables du point de vue chimique, car la seule variation dans la spécificité nous l'interdit, on est en droit de supposer malgré tout que leurs structures moléculaires sont apparentées et qu'elles appartiennent à une même famille de corps: bien que le rapprochement soit dangereux, on peut évoquer par analogie les anticorps qui se répartissent parmi les protéines du sérum, dans les globulines γ et très accessoirement β . Il est bien certain que les conclusions des auteurs dont nous avons précédemment rappelé les travaux n'apportent guère d'arguments favorables à cette façon de voir. Pour WIENHAUS l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* se compose d'un mélange d'albumine et de globuline; pour BOYD et REGUERA, celle du *Phaseolus Limensis* est une globuline, de même que celle du *Canavalia ansiformis* selon SUMNER et ses collaborateurs. SCHNEIDER, nous venons de le voir, assimile l'agglutinine du *Phaseolus multiflorus* à une protéose. RENKONEN, enfin, rapproche des mucoprotéines l'agglutinine purifiée qu'il extrait de *Vicia Cracca* et de *Phaseolus* sp.

En faisant pour le moment abstraction de ces conclusions divergentes, nous tenterons maintenant de faire le point des propriétés générales physicochimiques des agglutinines des Papilionacées, telles qu'on peut les dégager des travaux précités, pour exposer ensuite les résultats de nos propres recherches.

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES PROPRIÉTÉS AGGLUTININES
DES PAPILIONACÉES

Constitution élémentaire :

C	36	à	42 %
H	6,5	à	7,5 %
N	9	à	9,7 %
Cendres	5,7	à	13,2 %

Hydrates de Carbone	30 %
Rédaction du biuret	++

Solubilité et Précipitation :

Eau salée à 9°/°° et 11 % ...	Solubles.
Alcool à 50°	Insolubles (sauf pr BOURDILLON à pH 9).
Acétone à froid	Insolubles.
Alcool méthylique	Insolubles (BOURDILLON).
Alcool isopropylique	Solubles (BOURDILLON).
Ether	Insolubles.
Chloroforme	Insolubles.
Sulfate d'Ammonium à saturation	Insolubles.
Sulfate de Magnésie à saturation	Solubles.
Formol, au-delà d'une certaine concentration	Dénaturation.
Acide trichloracétique (10 %)	Solubles.
Acide tannique en solution..	Insolubles.
Thermostabilité	Les solutions d'agglutinine sont inactivées à partir de 90°.

RECHERCHES PERSONNELLES

Nos investigations ont eu pour but de préciser quelques-unes des données précédemment rapportées et de permettre la mise en œuvre de procédés de concentration de l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* L. Nous écartons volontairement le terme de purification qui nous paraît impropre à qualifier un produit dont l'obtention s'accompagne très probablement d'une notable dénaturation.

Nous avons envisagé successivement :

- l'action de la température ;
- l'action du pH ;
- l'action du Sulfate d'Ammonium ;
- l'action de l'alcool,

sur l'extrait de *Phaseolus vulgaris* L. var. Saxa que nous avons finalement soumis à l'électrophorèse sur papier.

1° ACTION DE LA TEMPÉRATURE

La stabilité de la « Phasine » à l'égard de la température a été recherché par WIENHAUS (48), qui fixe à 90° la limite supérieure au-delà de laquelle les propriétés agglutinantes disparaissent. Mais CAPPELETTI (9), au contraire, observe dès 75°

l'inactivation des extraits de pois et de lentilles. KOBERT (21) indique les températures d'inactivation d'un certain nombre d'agglutinines obtenues par macération dans l'eau salée, puis précipitation par l'alcool : nous en retiendrons celle de 70° à laquelle les agglutinines d'*Arachis hypogaea*, de Soja, de *Canavalia arborescens*, de *Dolichos lablab* perdent leur pouvoir. Comme la Phasine de WIENHAUS est un produit remanié par des précipitations alcooliques, nous avons repris cette question de la thermostabilité en expérimentant avec l'extrait végétal brut : l'extrait de *Phaseolus vulgaris* est chauffé au bain marie, à des températures variées, pendant un temps fixe de 60 minutes : après chauffage, le liquide est centrifugé pour éliminer les précipités qui sont apparus, puis dilué en vue d'un titrage.

Dans ces conditions, nous avons observé que, jusqu'au voisinage de 70° l'extrait conserve son activité initiale, en dépit des précipitations qui se sont produites en son sein, sous l'effet de la température. Au-delà de 70° on assiste à une baisse progressive de l'activité qui finit par s'annuler vers 90°.

Nous sommes donc en accord avec les résultats de WIENHAUS : l'agglutinine est inactivée à 90°, mais nous apportons la précision supplémentaire de la sensibilité partielle aux températures allant de 70° à 90°. La connaissance de ces phénomènes nous a permis de varier le mode préparation de l'extrait de *Phaseolus* : nous avons, en effet, préparé des extraits par digestion en eau physiologique non plus à 37° mais à 70°. Cette façon de faire a l'avantage de la rapidité, car on peut penser que l'extraction est accélérée par la température, et de fait le temps de contact a pu être raccourci à 30' au lieu de 2 heures. En outre, la formation à 70° d'un volumineux précipité et son élimination par filtration laissent à penser qu'on se débarrasse de produits inutiles.

Malgré tout, nous n'avons pas retenu ce mode d'extraction à 70° pour l'étude des propriétés physiques ou chimiques de l'agglutinine, car il nous était impossible *a priori* d'affirmer l'absence de dénaturation ou de remaniement moléculaire sous l'effet de la température.

2° ACTION DU pH

L'étude des substances protéiques montre qu'on peut les caractériser par leur point isoélectrique, c'est-à-dire par le pH auquel leurs fonctions acides et basiques sont en équilibre, et qui s'accompagne d'une diminution de leur solubilité : RENKONEN (39), pour le produit qu'il obtient par purification de l'extrait de *Phaseolus*, situe le minimum de solubilité entre les pH 2 et 3.

Nous avons procédé comme suit :

Des mélanges tampons sont préparés selon les formules proposées par CLARK et LUBS [cité par CALMETTE et coll. (8)] à l'aide de solutions de ClH , ClK , Soude, Phosphate monopotassique, Phtalate monopotassique et Acide borique : on peut de la sorte obtenir une gamme de tampons s'étalant de pH 1 à pH 10, de 0,4 en 0,4 unités de pH, sauf pour la zone entre pH 6 et 9 où les intervalles ont été réduits à 0,2. 4 cm^3 de chacun de ces mélanges tampons sont additionnés de 0 cm^3 2 d'extrait de *Phascolus* : après agitation tous les tubes sont abandonnés une nuit à + 4°. On observe alors qu'il y a eu formation d'un précipité dans tous les tubes à l'exception de ceux correspondant aux pH 6,4 à 8,1. En outre, on peut signaler à titre accessoire, le virage au jaune du pigment apporté à l'extrait par les téguments de la graine : ce virage est manifeste au-dessus de pH 8,5.

Le contenu des tubes est alors centrifugé et les liquides clairs surnageants sont soumis à une recherche d'agglutinine : en aucun cas, dans les limites de pH indiquées, c'est-à-dire de 1 à 10, l'agglutinine n'a été éliminée.

Dans le même ordre d'idées, mais sans précision de pH, WIENHAUS (48) a soumis l'extrait de *Phascolus* à une dilution par l'eau distillée : on sait, principalement après SANDOR que les euglobulines des sérums humains ou animaux précipitent dans de telles circonstances. Cette simple action de l'eau distillée entraîne d'après WIENHAUS la séparation de l'agglutinine à concentration à peu près égale dans les deux phases différentes : liqueur et précipité. Nous avons retrouvé ces résultats en opérant ainsi :

1 cm^3 d'extrait est additionné de 9 cm^3 d'eau distillée : il se forme un assez volumineux précipité qu'on abandonne à lui-même 2 heures à température du laboratoire. Le mélange est alors centrifugé : la liqueur surnageante séparée est rendue isotonique par addition de chlorure de sodium ; le précipité est repris à nouveau par 10 cm^3 d'eau distillée, centrifugé et lavé une nouvelle fois de la même façon : il est ensuite dissous dans 10 cm^3 d'eau physiologique. On dispose ainsi de 2 liqueurs isotoniques contenant : l'une, les substances restées en solution en présence de l'eau distillée ; l'autre, les composés qui ont au contraire précipité sous l'effet de la dilution. Ces deux liqueurs sont titrées, ainsi qu'une dilution équivalente de l'extrait initial servant de témoin : le résultat de ce tirage est le suivant :

extrait témoin	1/2560°
liqueur surnageante	1/1280°
précipité redissous	1/320°

Ces chiffres montrent qu'il n'y a pas eu passage total de l'agglutinine dans l'une des deux phases. Pouvons-nous en conclure, comme WIENHAUS, qu'il y a eu partage et que l'agglutinine est constituée de deux fractions qu'on peut dissocier par ce procédé à l'eau distillée, sans qu'elles perdent leur activité, l'une étant une globuline, l'autre une albumine ? Une telle hypothèse n'est pas à rejeter *à priori*, mais nous serions enclin à la formuler différemment : si l'on admet, encore que rien ne nous le prouve jusqu'à maintenant de façon indiscutable, que l'agglutinine est de nature globulinique, on peut penser qu'il s'agit non d'une molécule définie, mais d'un groupe de globulines très voisines se situant à la limite des euglobulines et des pseudoglobulines. L'objection, qu'en fait ce pourrait être une précipitation seulement partielle d'euglobuline parce que la dilution aqueuse est trop faible, ne résiste pas à la vérification expérimentale : nous avons en effet redilué secondairement le liquide surnageant sans obtenir de nouvelle précipitation.

Mais, sans préjuger aucunement de la véritable nature de l'agglutinine, on peut aussi supposer que c'est par adsorption qu'une partie du produit s'est fixée sur le précipité apparu au sein de l'extrait, l'excès restant en solution. Nous avons pratiqué une tentative très limitée pour explorer cet aspect de la question :

— un extrait de *Phaseolus* est additionné d'un demi-volume d'un plasma humain. Ce plasma provient de la centrifugation d'un sang recueilli en présence d'1/10° de son volume de citrate de soude à 4 %. Au mélange : 1 volume d'extrait + 0,5 volume de plasma, on ajoute 0,5 volume de solution de Chlorure de Calcium (2 gr. 8°/°° en sel anhydre) : après agitation le tube contenant ces trois solutions est maintenu 30 minutes à 37°. Dans ces conditions, le plasma recalcifié coagule ; il se forme un caillot de fibrine au sein du liquide. Après avoir décollé ce caillot des parois, on recueille la liqueur claire surnageante et on y titre l'activité agglutinante comparativement à l'extrait initial : si l'on tient compte de la dilution on observe alors que le titre de l'extrait n'a été aucunement abaissé par la formation en son sein d'un précipité de fibrine. Il n'y a donc pas eu d'adsorption de l'agglutinine sur la globuline.

Il n'y a pas lieu de généraliser cette conclusion et au contraire nous insistons sur le caractère très particulier de l'essai qui nous y a amené ; emploi d'une globuline bien spéciale,

précipitation à l'état fibrillaire, qui peuvent créer des conditions sans rapport avec celles réalisées dans l'expérience de simple dilution.

En résumé, la recherche d'un pH isoélectrique auquel l'extrait brut de *Phaseolus* perdrait son activité est restée négative. La dilution par l'eau distillée entraîne le partage de l'activité agglutinante entre le précipité et la liqueur surnageante ; telle quelle cette épreuve ne fournit pas d'arguments décisifs quant à la nature de l'agglutinine.

3° ACTION DU SULFATE D'AMMONIUM

Les substances salines en solution plus ou moins concentrée servent depuis longtemps à la différenciation des protéines : celles-ci peuvent être dans une certaine mesure caractérisées par la concentration d'un sel minéral qui les précipite totalement. C'est ainsi que très classiquement la séparation entre la sérum-albumine et les globulines du sérum humain s'obtient par le Sulfate d'Ammonium à demi-saturation. Ces méthodes, dites de « relargage », utilisent des substances très variées : sulfate d'ammonium, sulfate de sodium, sulfate de magnésium, phosphates alcalins, sulfite de sodium, etc...

Nous avons rappelé précédemment les résultats des divers auteurs qui ont établi la solubilité des hémagglutinines de Papilionacées dans le sulfate de magnésium à saturation, et leur insolubilité dans le sulfate d'ammonium également saturé. Nous nous sommes préoccupé de trouver pour l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* le seuil de précipitation en présence de certaines substances salines ; le principe de cette recherche consiste à mettre l'extrait de *Phaseolus* en présence de concentrations salines variées, à séparer les précipités éventuels et à rechercher l'agglutinine restante dans le liquide clair surnageant. Mais comme ces opérations se déroulent en milieu salin concentré, la recherche de l'agglutinine est rendue malaisée par l'extrême hypertonie du milieu. On se trouve alors dans la nécessité de débarrasser le liquide de l'excès de sel qu'il contient : ce résultat s'obtient par dialyse. Nos possibilités techniques ne nous permettaient que des dialyses sur membrane de collodion, préparées comme nous le verrons ci-après. Nous avons dans cet esprit entrepris l'étude du relargage éventuel de l'agglutinine par le sulfite neutre de sodium, dont l'influence sur les protéines plasmatiques est connue avec précision [Berger (1)] : nous nous sommes heurté alors à la très faible diffusion du sulfite qui rendait les dialyses inopérantes. C'est pourquoi nous nous sommes finalement cantonné dans l'étude de l'action du sulfate d'ammonium que nous relatons maintenant en détail.

Matériel

- 1° Solution saturée de Sulfate d'Ammonium à la température du laboratoire.
- 2° Extrait de *Phaseolus vulgaris*.
- 3° Tubes à dialyse : ce sont des tubes de verre de 30 mm. de diamètre et de 25 cm. de long, obturés par une membrane obtenue en trempant une des extrémités dans du collodion officinal épaissi par évaporation. La membrane de collodion obtenue après départ du solvant est d'épaisseur non contrôlée.

Technique

Nous limitons l'exposé technique aux seuls tubes intéressants. On répartit le sulfate d'ammonium, l'extrait de *Phaseolus*, ainsi que de l'eau distillée selon le tableau suivant :

NUMERO DES TUBES	1	2	3	4
Sulfate d'ammonium saturé	5	6	7	8
Eau distillée	3	2	1	0
Extrait de <i>Phaseolus</i>	2	2	2	2
Coefficient final de saturation en sulfate d'ammonium	0,5	0,6	0,7	0,8

Les tubes sont agités et bouchés, puis abandonnés 12 heures à la température du laboratoire.

Au bout de ce temps les 4 tubes sont centrifugés : on prélève alors dans chacun 1 cm³ du liquide surnageant qu'on introduit dans un tube à dialyse, au contact d'eau salée à 9°/°° : la dialyse se poursuit 24 heures en chambre froide en renouvelant l'eau salée après 12 heures.

Le contenu de chacun des tubes dialyseurs est recueilli séparément et amené au volume de 10 cm³ à l'aide de l'eau salée : c'est sur ces solutions qu'on effectue la recherche et le titrage de l'agglutinine selon le procédé usuel.

Résultats

On constate alors que l'activité du liquide issu des tubes 1 et 2 est à peine inférieure à celle de l'extrait initial, compte tenu de la dilution ; celle du tube 3 est environ moitié moindre ; celle du tube 4 est nulle.

On peut donc en conclure que la précipitation totale de l'agglutinine survient entre 70 et 80 % de la saturation en sulfate d'ammonium. Malheureusement il n'est pas possible

d'utiliser cette propriété pour un fractionnement éventuel de l'extrait et un isolement approximatif de l'agglutinine, car celle-ci est déjà partiellement entraînée dans les précipités où on la retrouve pour chacun des 4 tubes.

4° UTILISATION DE L'ALCOOL POUR CONCENTRER L'AGGLUTININE

Nous avons relaté au début de ce chapitre les diverses méthodes dites de purification qui mettent en jeu le pouvoir précipitant de l'alcool à l'égard de substances sans intérêt ou à l'égard de l'agglutinine, selon le titre qu'on emploie. Nous avons envisagé ce problème dans le but essentiellement pratique d'encadrer l'agglutinine entre deux précipitations successives, la première éliminant des produits encombrants, la deuxième permettant de la récolter sous forme d'un précipité, soluble dans un volume d'eau salée choisi à volonté. Des essais systématiques en présence de concentrations alcooliques croissantes nous ont conduit aux résultats suivants : l'extrait de *Phaseolus vulgaris*, dilué à 1/10° en milieu alcoolique, perd totalement son activité agglutinante quant le titre du mélange final avoisine 55°. La précipitation de l'agglutinine étant encore très sensible à 40°, nous avons choisi comme titres alcooliques successifs :

— 30° en premier lieu pour éliminer les substances inactives. Nous rejoignons en cela RENKONEN (41), mais il est bon de préciser que même à cette concentration, il y a déjà une perte d'agglutinine par précipitation ;

— 50° ensuite pour séparer la majeure partie de l'agglutinine, de la même façon que WIENHAUS (48) pour préparer la Phasine.

Il est à noter d'emblée qu'entre ces deux concentrations alcooliques on ne peut espérer récupérer la totalité du principe actif, puisqu'une partie en est déjà éliminée à 30° et qu'à 50° on en retrouve encore dans la liqueur surnageante. Malgré tout, notre but n'était pas d'isoler toute l'agglutinine, mais simplement de disposer d'un procédé permettant sa concentration à volonté.

Enfin, empruntant à RENKONEN (40) l'utilisation du chloroforme pour laver sa préparation purifiée, nous faisons précéder l'action de l'alcool par une extraction chloroformique de la poudre de graines à l'appareil de SOHLET : le liquide chloroformique d'extraction ne recèle pas d'agglutinine comme nous avons pu nous en assurer après évaporation et reprise du résidu par l'eau salée.

En tenant compte de ces données, nous proposons le procédé suivant :

20 gr. de poudre fine de semences de *Phaseolus vulgaris* sont épuisés pendant 3 heures dans un appareil de SOHLET à l'aide de chloroforme. La poudre est ensuite exposée à l'air jusqu'à évaporation complète du chloroforme qui l'imprègne. On l'introduit alors dans une fiole avec 46 cm³ d'eau physiologique et 20 cm³ d'alcool à 97°. Le récipient, soigneusement bouché est maintenu 12 heures à 37°. On en filtre ensuite le contenu. Le liquide clair obtenu est additionné de la moitié de son volume d'alcool à 97°, ce qui a pour conséquence d'élever le titre alcoolique de 30° à 50° : il apparaît dans ces conditions un important précipité qu'on isole par centrifugation, qu'on lave à l'alcool à 50° et qu'on reprend par un volume d'eau physiologique de quelques centimètres cubes. Il reste un résidu insoluble ; la partie liquide constitue l'agglutinine concentrée.

Nous ne prétendons nullement qu'il s'agit là d'une méthode d'isolement, mais d'un procédé qui pourrait, appliqué à des graines pauvres en agglutinine, et néanmoins intéressantes par leur spécificité, rendre leur utilisation possible, par exemple, pour les groupages sanguins.

5° APPLICATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse est utilisée par RENKONEN (40) pour vérifier la pureté de la préparation qu'il obtient après traitement d'un extrait de *Phaseolus* par la méthode de purification qu'il a proposée : nous avons reproduit précédemment le diagramme correspondant. Il ne nous renseigne malheureusement pas sur la mobilité électrophorétique de la substance en jeu. De toute manière, si l'on admet qu'il s'agit bien d'une substance protéique, on peut redouter que certaines phases de sa purification, en particulier le contact avec l'alcool, ne la dénature et n'en altère les caractéristiques électrophorétiques.

Nous avons préféré nous adresser à l'extrait végétal brut, et le soumettre à l'électrophorèse, sans aucun traitement préalable. Notre équipement nous permettait d'effectuer des microélectrophorèses sur papier, à l'aide du dispositif de MACHEBŒUF et ses collaborateurs, c'est-à-dire des électrorhéophorèses (29) (30). Cette méthode sur papier présente entre autres avantages ceux d'offrir la possibilité de mettre en évidence, outre les protéines sans distinction, les glucides réducteurs libres et les glucoprotéides neutres, et d'isoler par élution les fractions séparées par le courant.

Matériel et méthodes

L'extract de *Phaseolus vulgaris* est soumis à l'Electrophorèse, selon le dispositif de MACHEBŒUF et REBEYROTTE, pendant 6 heures, à basse tension. Le mélange tampon est celui de DURRUM, à base de véronal et véronal sodique, qui fixe un pH de 8,6.

Les bandes de papier, après passage du courant, ont subi quatre traitements différents :

— révélation, par le bleu de bromothymol, en solution alcoolique saturée de Cl_2Hg , pour mettre en évidence la migration des protéines ;

— élution, par l'eau salée, d'après la technique de GANZIN et MACHEBŒUF (16), permettant l'isolement en faible quantité des fractions séparées par le courant ;

— révélation par le phtalate d'aniline, selon PARTRIDGE (38), qui permet la localisation des glucides réducteurs ;

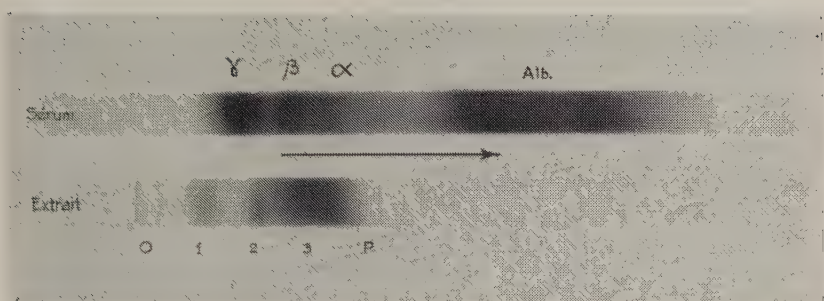
— révélation par la coloration « Periodic-Acid-Schiff », selon RAYNAUD et collaborateurs (39), des glucoprotéides neutres.

Résultats

1° L'Electrophorèse, pratiquée dans les conditions définies plus haut, a donné, après traitement par le bleu de bromothymol, le diagramme reproduit ci-après. Sur la même bande, figure le diagramme d'un sérum, obtenu au cours de la même opération et qui va servir de référence. On peut voir, sur le diagramme du *Phaseolus*, 3 fractions révélées par le bleu de bromothymol :

1. l'une qui a migré en sens inverse du courant et qui a dépassé, dans cette direction, les γ globulines du sérum ;
2. une zone correspondant à la tache de départ et traduisant, probablement, la présence, dans l'extract, de substances non dissoutes, responsables, également, de sa légère opalescence ;
3. la dernière, enfin, très colorée, qui a parcouru le même chemin que les α et β globulines sériques.

Nous avons figuré, en outre, par une légère marque au crayon : P, l'emplacement du pigment jaune du tégument de la graine ; il est visible sur la bande de papier au sortir de l'appareil, mais disparaît à la révélation.



2° Dans ces mêmes conditions expérimentales, nous avons procédé à l'Electrophorèse de 75 mm³ d'extrait, disposés sur la ligne de départ, selon un trait continu, arrêté à 5 mm. des bords du papier. La migration une fois achevée, on découpe, dans le papier humide, une bande centrale, laissant pour la révélation ultérieure deux marges d'environ 2 cm. 5.

La bande centrale et les deux marges sont repérées et divisées, au crayon, en 3 fractions établies par comparaison avec des diagrammes obtenus dans les mêmes conditions, au cours d'opérations antérieures. Les 3 fractions de la bande centrale sont découpées et placées, encore humides, dans un dispositif à élution lente, par l'eau physiologique, suivant le principe de GANZIN et MACHEBŒUF (16). L'élution dure 24 heures.

Les deux marges sont soumises au bleu de bromothymol. ce qui permet de vérifier que le découpage correspond bien à des fractions distinctes.

L'élution terminée, on obtient environ 0 cm³ 5 de solution de chacune des 3 portions mises en œuvre ; on ajoute, dans les 3 tubes, un égal volume de suspension globulaire, à 1 %. Après 2 heures de contact, à 20°, on observe une agglutination très nette dans le tube correspondant à la fraction 1, qui a remonté le sens du courant. Les 2 autres tubes ne sont pas modifiés.

On peut donc en conclure : que le pouvoir agglutinant, présenté par l'extrait dans l'eau physiologique de semences de haricot est lié à des protéines, manifestant à l'Electrophorèse, dans les conditions définies plus haut, une mobilité moins grande que les globulines γ du sérum humain. Il est même permis de se demander si cette mobilité n'est pas nulle et si l'on n'a pas à faire à une substance inerte, au point de vue électrique. Pour répondre à cette question, il est nécessaire de rechercher, dans les conditions expérimentales déjà définies, la ligne de flux neutre, c'est-à-dire le niveau de la bande de papier, où sont transportées les substances électriquement inertes.

3° Dans ce but, nous avons soumis à l'Electrorhéophorèse une solution de glucose. Le papier, traité ensuite par le phtalate d'aniline, révèle la position du sucre et détermine la ligne de flux neutre.

Nous avons opéré de même, aux dépens de l'extrait de *Phaseolus* : le papier, après traitement au phtalate d'aniline, montre une zone très légère à un niveau identique à celui du glucose. Nous l'avons soulignée, au crayon, O, sur le cliché, pour la rendre plus visible. Le diagramme est ensuite traité par le bleu de bromothymol, qui met en évidence les fractions protéiques, déjà signalées. On constate alors, que la fraction 1, à laquelle est liée la substance agglutinante, ne donne pas de coloration, avec le phtalate d'aniline, et se situe entre la ligne de flux neutre et le point de transport des globulines γ du sérum humain.

4° Etant donné le rapprochement fait par RENKONEN (41) entre les agglutinines de Papilionacées et les mucoprotéines, nous avons soumis une bande de papier ayant servi de piste à 75 mm³ au cours d'une électrorhéophorèse, à la coloration acide périodique Schiff qui peut nous révéler une partie des glucoprotéines : on n'obtient ainsi qu'une réaction très discrète au niveau de la fraction 3. Il n'est pas indifférent de noter que cette technique de révélation valable pour le sérum humain atteint et dépasse peut-être les limites de sa sensibilité avec l'extrait végétal plus pauvre au moins en protéines totales.

Résumé

L'Electrorhéophorèse permet de montrer que la substance agglutinant les hématies, qu'on rencontre dans les semences de *Phaseolus vulgaris* L., est liée à des protéines de mobilité inférieure aux globulines γ du sérum humain, qu'elle ne contient pas à l'état libre de glucides réducteurs, et en particulier d'acides uroniques et qu'elle ne semble pas chargée en glucoprotéines neutres.

Conclusion

De cette étude de certains aspects physicochimiques des agglutinines de Papilionacées, où nous avons rappelé les principaux travaux constituant l'essentiel de la connaissance dans ce domaine avant d'exposer nos quelques résultats, nous pouvons déduire les notions suivantes qui sont beaucoup plus des bases de discussion que des conclusions véritables :

La nature chimique exacte de l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* n'est pas encore connue : si le sulfate d'ammonium à saturation, en la précipitant totalement, concourt à la localiser parmi les substances protéiques, les hypothèses formulées

par les divers auteurs la rapprochent successivement de plusieurs catégories de protides : albumines, globulines, protéoses, mucoprotéines.

Il nous semble difficile d'admettre sans discussion qu'il s'agisse exclusivement de globulines, étant donnée la solubilité au moins partielle dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation, et c'est à des protéines de molécule moins importante qu'elle devrait être rattachée.

En faveur de son appartenance au groupe des albumines, et une agglutinine toxique, la ricine, a été identifiée à une albumine par Y. MOULÉ (37), on peut retenir, outre ce comportement vis-à-vis du sulfate d'ammonium, sa solubilité relative dans l'eau distillée, le sulfate de magnésie et sa résistance au chauffage.

Mais sa solubilité dans l'acide trichloracétique dilué pousse même à la placer parmi des protéides beaucoup plus simples, du type des protéoses, pour reprendre le terme que SCHNEIDER applique au principe agglutinant du *Phaseolus multiflorus*, quelle que soit son imprécision.

On notera que nous ne faisons appel dans cette discussion qu'à des caractères de solubilité : les caractères de précipitation ont été volontairement écartés, car on ne peut exactement faire la part des phénomènes d'adsorption susceptibles d'altérer les résultats : c'est pourquoi nous n'opposerons pas à l'hypothèse de RENKONEN (41), qui apparente l'agglutinine aux mucoprotéines, le fait qu'elle disparaît de ses solutions à la température de 90°.

Il nous paraît indéniable que l'agglutinine soit constituée de protéines simples étant donné son degré de stabilité en présence de certains agents dénaturants ou précipitants : mais la difficulté résulte de ce qu'à la faveur de ces facteurs de précipitation et de dénaturation, une fraction de l'agglutinine semble entraînée, sans perdre sa propriété agglutinante fondamentale. C'est cette véritable duplicité qui a conduit WIENHAUS (46) à la considérer comme un mélange d'albumine et de globuline, structure déjà proposée pour l'Abrine (dans BROCCO-ROUSSEU et FABRE (7)).

Il nous semble possible d'émettre une double hypothèse susceptible d'expliquer cette particularité :

On peut d'abord, et nous l'avons implicitement proposé un peu plus haut, supposer que l'agglutinine est une protéine simple, tel un polypeptide, par exemple, ce qui expliquerait ses caractères de solubilité et n'irait pas contre le résultat de l'électrophorèse, et que cette protéine simple aurait la faculté

de s'adsorber partiellement sur des précipités protéiques apparus au sein de la solution.

En second lieu, on peut également imaginer que l'agglutinine est une protéine au contraire complexe, faite de deux parties, l'une faisant office de substrat, l'autre celui de groupement prosthétique : les réactifs précipitants auraient pour effet de provoquer le relargage de cette protéine en même temps que sa dénaturation partielle.

A la faveur de cette dénaturation les liaisons unissant le substrat au groupement prosthétique se rompraient et ce dernier resterait en solution, tout en conservant ses propriétés : sa libération expliquerait la persistance des propriétés agglutinantes dans la solution, cependant que la présence d'agglutinine dans le précipité témoignerait de ce que la dénaturation accompagnant le relargage n'a pas été totale et qu'une partie du composé précipité a conservé sa structure initiale.

Ces deux hypothèses ont un côté commun, c'est qu'elles associent le pouvoir agglutinant à une substance protidique simple qui constituerait l'agglutinine en totalité selon la première hypothèse ou selon la deuxième, seulement sa partie active, libérable dans certaines conditions.

Est-il légitime d'étendre ces notions de structure supposée aux autres agglutinines de Papilionacées ? Ce serait admettre entre elles une similitude chimique, une parenté de constitution que l'étude sérologique que nous allons aborder maintenant nous interdit, au moins sous une forme stricte et rigoureuse.

ÉTUDE

**DES PROPRIÉTÉS DE LA PHYTOAGGLUTININE
ENVISAGÉE SOUS L'ANGLE SÉROLOGIQUE**

L'existence de propriétés hémagglutinantes chez certains végétaux pose un problème fondamental : celui d'une parenté éventuelle entre les substances qui sont dans l'organisme animal les supports de la spécificité sérologique, et les substances antagonistes que le règne végétal est susceptible de recéler et qui pourraient constituer la preuve indirecte d'une communauté antigénique s'étendant à tout le monde vivant.

Pour ne considérer la question que sous un angle simple et limité, rappelons brièvement que l'espèce humaine possède dans ses hématies 2 antigènes A et B parmi d'autres, dont l'inégale distribution permet de diviser les sangs, et, partant, les individus, selon que les hématies contiennent l'un, l'autre, les deux ou aucun de ces antigènes : ce sont les 4 groupes sanguins fondamentaux A, B, AB et O. Signalons que la substance A est en réalité complexe et qu'on distingue en fait 2 substances A1 et A2, ce qui entraîne une subdivision des groupes possédant ce facteur A.

L'étude du sang, toujours dans l'espèce humaine, permet de mettre en évidence, dans les sérums cette fois et non dans les globules, des substances antagonistes des précédentes, dites α et β . Les substances A et α , de même que B et β , ont entre elles des rapports de spécificité analogues à ceux qui apparentent un antigène à l'anticorps correspondant : mises en présence elles se combinent, et les globules introduits dans la réaction pour apporter le facteur A ou B s'agglutinent en amas sous l'effet de cette combinaison : antigène-anticorps. C'est pourquoi les substances α et β portent le nom d'agglutinines.

Les recherches d'auteurs finlandais et américains ont montré qu'à côté des plantes comme le *Phaseolus vulgaris* L., étudié par WIENHAUS (48), dont les graines sous forme d'extrait aqueux peuvent agglutiner les globules humains de tous groupes et de nombreux globules animaux, on peut trouver d'autres plantes beaucoup plus rares, aux propriétés agglutinantes nettement spécifiques.

RENKONEN (40) signale que parmi les graines agissant sur les divers types de globules, nombreuses sont celles dont l'action est plus prononcée vis-à-vis des globules O que des globules A et B. Il montre que *Vicia cracca* agglutine plus puis-

samment A1 et A1B et que *Cytisus sessilifolius* agglutine surtout A2 et O. Etudiant *Vicia Cracca* (41) il pense établir le caractère antigénique de la substance agissante et sa dissemblance d'avec les agglutinines humaines anti A.

KOULUMIES (23) compare sur 100 échantillons de sang l'activité de *Vicia Cracca* et *Cytisus sessilifolius* : d'une façon générale, celle de *Vicia cracca* est plus marquée pour les hématies A1 mais bien que plus faible, elle peut se manifester pour les hématies A2. Le *Cytisus*, d'une activité moins grande en général, reste plus étroitement spécifique, et KOULUMIES ne constate son action que sur des hématies A2 ou O, et jamais sur des hématies A1, A1B ou A2B. Il admet en conclusion la possibilité d'une différenciation des sous-groupes A1 et A2 à l'aide de ces deux extraits de plante.

BOYD et REGUERA (6), passant en revue un certain nombre de plantes, décèlent entre autres, à côté de certains extraits hémolytiques, l'action agglutinante faible mais spécifique des semences de *Vitis aestivalis* à l'égard des globules B. Ils remarquent également l'action de *Phaseolus Limensis* var *limeanes* sur les globules A1 surtout, et A2 : comme certains échantillons manifestent, en outre, un faible pouvoir sur les globules B, les auteurs s'essayent et parviennent à le supprimer, et à conserver uniquement la spécificité anti A par simple contact prolongé avec du formol.

KOULUMIES encore (23), poursuivant l'étude du *Cytisus sessilifolius* après purification, et l'éprouvant sur toute une série de globules de génotypes bien définis, montre que l'addition de substance H ou antigène hétérophile de Forssman, sous forme de salive de sujets sécréteurs fait disparaître l'action anti O de l'extrait végétal : il en arrive ainsi à la conclusion que l'extrait de *Cytisus sessilifolius* agit par des agglutinines anti H.

BIRD (2), s'intéressant au *Dolichos biflorus* agissant sur des hématies du groupe A, l'étudie dans son comportement vis-à-vis de l'extrait de rein de cobaye, riche en antigène de Forssman et constate que son titre n'est pas abaissé au contact de cet antigène. Comparant de plus l'extrait végétal à des sérums riches en anticorps de Forssman, il ne constate aucun parallélisme, et à l'encontre des conclusions de KOULUMIES pour le *Cytisus*, il n'admet pas de relation entre le système de Forssman et la spécificité des agglutinines végétales qu'il pense plus proches des anticorps anti A d'origine humaine.

Récemment, CAZAL et LALAUURIE (10), après avoir établi une liste de 420 légumineuses (1), dont ils donnent le comportement

(1) Les auteurs ont complété leur travail par une liste de légumineuses qu'on peut consulter au Laboratoire de Matière médicale et Botanique de la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

en matière d'agglutinines, reprennent l'étude des propriétés de *Vicia Cracca* et y ajoutent celles d'*Ulex provincialis* (Lois.) : les semences d'*Ulex provincialis* présentent une activité maxima vis-à-vis des globules O, plus modérée à l'égard des globules A2, faible pour B et nulle pour A1. Ils rapprochent cette agglutinine de l'hétéroagglutinine anti H et mettent en évidence sa sensibilité à la température : les taux lisibles à 20° sont supérieurs à ceux qu'on obtient à 37° ou à 4°. Au contraire, l'agglutinine de *Vicia Cracca* reste indifférente à la température où s'effectue la réaction (au moins dans les limites précédentes) ; elle agit fortement sur les globules A1 et faiblement sur les globules A2 mais ces deux activités sont indissociables : l'absorption de l'agglutinine par les globules A2 fait, en effet, disparaître son activité à l'égard des globules A1.

Enfin, KRUPÉ (24) et ses collaborateurs envisagent sérieusement la possibilité de substituer aux sérums utilisés pour la recherche des groupes sanguins, des extraits végétaux convenablement choisis. Ils rappellent la liste des plantes dont l'action est spécifique et en particulier l'existence d'agglutinine anti B chez *Sophora Japonica*.

Nous nous sommes proposé de rechercher par des méthodes sérologiques si l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris* L., qui manifeste dans les conditions usuelles une activité très étendue vis-à-vis des différentes catégories d'hématies, ne pouvait, dans des circonstances particulières ou par un artifice quelconque, présenter une activité préférentielle pour tel ou tel groupe, ce qui aurait pour conséquence de la mettre sur un plan identique aux agglutinines végétales spécifiques déjà citées. Ainsi, ce type d'agglutinines polyvalentes, le plus fréquent chez les végétaux, pourrait acquérir une spécificité relative, et prenant place aux côtés des autres, élargirait la possibilité d'une différenciation groupale des plantes, déclarée vraisemblable par HIRSZFELD (19). En outre, une étude sérologique menée dans ce sens doit permettre d'éclaircir les rapports qui existent ou font défaut entre l'agglutinine végétale et les agglutinines humaines.

Nos essais peuvent être classés de la façon suivante :

- 1° Etude directe des propriétés de l'agglutinine végétale ;
- 2° Etude des propriétés d'antisérums expérimentaux obtenus à l'aide de l'extrait végétal.

I. — ÉTUDE DIRECTE DES PROPRIÉTÉS DE L'AGGLUTININE VÉGÉTALE

1. Action sur les différents groupes d'hématies

L'indifférence de l'extrait de *Phaseolus vulgaris* quant au groupe sanguin des hématies qui lui sont soumises a été établie

par RENKONEN (40). Nous avons abouti à la même conclusion : nos essais furent menés dans les conditions habituelles, à l'aide d'un extrait récent à 1/10 mis en présence de suspensions globulaires des groupes A1 Rh+, A2 Rh+, B Rh+, O Rh+, O Rh—. Les taux d'agglutination observés sont les mêmes pour toutes les catégories, pourvu que l'expérience soit menée de façon exactement superposable d'une série à l'autre. En particulier, la raison la plus fréquente d'échec est l'inégale concentration des suspensions de globules : aussi avons-nous dû utiliser des suspensions soigneusement contrôlées par numération.

En dehors des hématies humaines, les hématies de diverses espèces animales ont été mises en présence d'extrait de *Phaseolus vulgaris* : c'est principalement WIENHAUS (48) qui a pratiqué dans ce sens des essais systématiques dont nous reproduisons ci-dessous les résultats :

Animaux dont le sang est agglutiné par la Phasine de WIENHAUS :

Cheval	Cobaye
Porc	Grenouille
Chien	Coq
Chat	Pigeon
Lapin	Moineau

Animaux dont le sang n'est pas sensible à la Phasine :
Bœuf (et veau), Carpe

Toujours selon WIENHAUS, les globules de moutons se montreraient à la limite de la sensibilité, leur comportement restant douteux. Sans vouloir établir une liste détaillée de la réaction des diverses espèces animales au contact de l'extrait de *Phaseolus*, nous avons été amené à constater comme WIENHAUS, la sensibilité des hématies de chien, de lapin, le cobaye, l'indifférence de celles du bœuf, mais en ce qui concerne le mouton nous n'avons jamais rencontré d'échantillons de sang sur lesquels l'extrait végétal n'ait pas une action prononcée.

2. Absorption de l'agglutinine par les hématies des divers groupes

Principe : Le contact, avec une quantité importante d'hématies, permet la fixation de l'agglutinine sur ces hématies, et a pour conséquence un abaissement très notable du pouvoir agglutinant du liquide surnageant. Nous avons pratiqué de tels essais de fixation en utilisant les 4 catégories de globules, et en recherchant ensuite dans chacun des liquides surnageants, compte tenu de la dilution, si la chute du taux d'agglutination est la même vis-à-vis des hématies des 4 groupes.

Matériel :

L'extrait de *Phaseolus vulgaris* L.

Les hématies lavées de sujets des groupes A₁, A₂, B et O, tous Rh +.

Technique :

A. — ABSORPTION - Dans 4 tubes centrifugeurs on introduit 1 cm³ d'extrait dilué préalablement à 1/4 et 1 cm³ de culot globulaire d'un des 4 groupes. Les tubes sont bouchés, agités et maintenus à 37° 2H. Au bout de ce temps on les centrifuge et on recueille les liquides surnageants, dépourvus d'hématies. On procède alors au titrage de ces liquides.

B. — TITRAGE - Il est effectué par la technique habituelle, déjà décrite, par dilution, de proche en proche, chaque liquide étant étudié parallèlement dans son comportement vis-à-vis des 4 types globulaires. En même temps on procède au titrage de l'extrait simplement dilué pour pouvoir établir la valeur de l'abaissement d'activité par rapport à un témoin.

C. — RÉSULTATS - Les taux limites d'agglutination, ramenés à l'extrait pur, sont consignés dans le tableau :

EXTRAIT ABSORBE PAR LES GLOBULES		A ₁	A ₂	B	O	EXTRAIT NON TRAITÉ
Taux d'agglutination vis-à-vis des globules	A ₁	1/8	1/4	1/8	1/8	1/5.120
	A ₂	1/4	1/4	1/4	1/4	1/5.120
	B	1/4	1/4	1/4	1/4	1/5.120
	O	1/8	1/8	1/8	1/8	1/5.120

CONCLUSION :

L'absorption par les différents groupes d'hématies provoque une chute importante du taux d'agglutination mais il n'y a pas de variations notables dans l'activité résiduelle à l'égard des divers groupes, ce qui ne fait que confirmer une conclusion dans ce sens de RENKONEN (38).

3. Neutralisation croisée entre l'agglutinine végétale et les agglutinines humaines

Principe : Des globules lavés étant saturés par une agglutinine humaine ou végétale, on recherche ensuite s'ils peuvent encore ou non absorber l'autre agglutinine (végétale ou humaine).

Matériel :

GLOBULES : nous utilisons 2 sangs citratés, l'un A₁ Rh +, l'autre B Rh +. Ces rangs sont lavés à 4 reprises dans l'eau salée à 9°/100. Pour l'absorption ce sont les culots globulaires qui vont servir. Pour le titrage des agglutinines c'est la suspension globulaire à 5 % obtenue à partir du culot.

AGGLUTININES :

Les agglutinines humaines sont des sérums anti A et anti B provenant du Centre de Transfusion de Toulouse, que nous avons dilués à 1/4 avant l'emploi.

L'agglutinine végétale est l'extrait à 10 % de Phaseolus que nous avons dilué à 1/5.

Absorption :

Nous ne décrivons la technique que pour les globules A, elle est exactement superposable pour les globules B et se mène parallèlement.

Dans un tube centrifugeur on introduit :

1 cm³ de culot globulaire

2 cm³ de sérum anti A dilué

Dans un tube indentique on introduit de même :

1 cm³ de culot globulaire

2 cm³ d'extrait de Phaseolus dilué

Après agitation et bouchage les deux tubes sont placés 2 heures à 37°, puis centrifugés : les liquides surnageants sont mis de côté et les culots sont lavés 3 fois à l'eau salée. Ces culots ainsi lavés sont remis en suspension dans 2 cm³ d'extrait de Phaseolus dilué, pour celui du premier tube, et dans 2 cm³ de sérum anti A dilué pour l'autre resté dans le deuxième.

Les deux tubes sont rebouchés, agités et laissés à 37° 2 heures. Au bout de ce temps on centrifuge pour recueillir les liquides surnageants.

Titrage :

On effectue 4 séries témoins pour évaluer le taux initial d'agglutination de l'extrait végétal vis-à-vis des globules A₁ et B, et des sérums anti A vis-à-vis de A₁, anti B vis-à-vis de B.

Puis 4 autres séries sont disposées pour connaître l'activité des agglutinines humaines ou végétales après leur absorption par les globules correspondants.

Enfin, 4 dernières séries permettent de mesurer le titre des agglutinines qu'on a tenté d'absorber par les globules déjà saturés par une agglutinine étrangère.

Les suspensions globulaires sont à 5 % et employées à raison d'une goutte pour 0,4 cm³.

Résultats :

Ils sont consignés dans le tableau de la page suivante.

Interprétation :

L'examen du tableau permet de considérer que :

- l'effet protecteur du sérum anti A à l'égard de globules qu'on soumet au Phaseolus est important ;
- l'effet protecteur du Phaseolus à l'égard de globules qu'on soumet au sérum anti A est total ;
- l'effet protecteur du sérum anti B à l'égard de globules qu'on soumet au Phaseolus est minime ;
- l'effet protecteur du Phaseolus à l'égard de globules qu'on soumet au sérum anti B est médiocre.

Mais étant donnée la perte totale d'activité des sérums anti A et anti B après leur absorption par les globules A et B. il se peut que ces globules soient incomplètement saturés et que par suite l'effet protecteur recherché avec les antisérums puisse être masqué par la présence d'hématies encore libres : cet argument ne semble s'appliquer éventuellement qu'aux globules B puisque l'effet protecteur obtenu avec le sérum anti A est très important. Néanmoins nous avons repris l'ensemble de l'expérience dans des conditions un peu différentes, sérums et extrait de Phaseolus étant employés purs ; le reste du protocole expérimental est inchangé. Les résultats correspondants figurent au deuxième tableau :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentration en extrait ou en sé- rum	1/2											1/4096
Extrait Phaseolus non traité, sur gl. A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extrait Phaseolus non traité, sur gl. B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sérum anti A sur gl. A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Sérum anti B sur gl. B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
Extrait Phaseolus sur gl. A après absorption	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
Extrait Phaseolus sur gl. B après absorption	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Sérum anti A sur gl. A après ab- sorption	+	+	+	+	+	+	+	(+)	0	0	0	0
Sérum anti B sur gl. B après ab- sorption	+	+	+	+	+	(+)	0	0	0	0	0	0
Extrait Phaseolus absorbé par gl. A déjà saturés par sérum anti A.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
Extrait Phaseolus absorbé par gl. B déjà saturés par sérum anti B....	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Sérum anti A ab- sorbé par gl. A déjà saturés par Phaseolus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Sérum anti B ab- sorbé par gl. B déjà saturés par Phaseolus	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0

Interprétation :

- l'effet protecteur du sérum anti A est impossible à observer ici, l'activité du Phaseolus ayant chaque fois atteint l'extrême limite de la gamme de dilution utilisée ;
- l'effet protecteur du Phaseolus à l'égard de globules qu'on soumet au sérum anti A est total ;
- l'effet protecteur du sérum anti B à l'égard de globules qu'on soumet au Phaseolus est nul, mais la marge d'observation est assez étroite ;
- l'effet protecteur du Phaseolus à l'égard de globules qu'on soumet au sérum anti B existe : nous renonçons à le qualifier d'intense ou de modéré en raison ici aussi de l'étroitesse de la marge d'observation.

CONCLUSION :

La confrontation de l'ensemble des résultats montre qu'il y a réciprocité d'action entre l'agglutinine végétale et l'agglutinine anti A humaine, l'action de l'une sur des globules empêchant la fixation de l'autre ; les rapports entre l'agglutinine humaine anti B et le Phaseolus semblent moins étroits.

4. *Action sur l'agglutinine végétale, de l'extrait de rein de cobaye, riche en antigène de Forssman*

L'hypothèse de rapports entre certaines agglutinines végétales et le système des antigènes de Forssman a été soulevée d'abord par KOULUMIES (23) et étudiée ensuite par BIRD (2) comme nous l'avons rappelé plus haut. Ils s'adressaient à des végétaux présentant une spécificité anti A, l'un travaillant sur les semences de *Cytisus sessilifolius*, l'autre sur celles de *Dolichos biflorus*. Nous avons abordé sous cet angle l'étude du *Phaseolus vulgaris* L. dans les conditions que voici :

Principe :

Mettre en contact l'extrait végétal avec une préparation riche en antigène de Forssman. Comparer ensuite les propriétés agglutinantes de l'extrait ainsi traité à celles de l'extrait initial, en s'adressant aux diverses catégories de globules.

Matériel :

L'extrait de *Phaseolus vulgaris* ;

L'extrait de rein de cobaye, délivré par l'Institut Pasteur, riche en antigène de Forssman, et utilisé couramment pour les réactions sérologiques servant au diagnostic de la mononucléose infectieuse (PAUL et BUNNEL).

Les suspensions à 1 % de globules lavés des groupes O, A1, A2 et B.

Technique :

Nous l'avons calquée sur celle de la réaction de PAUL et BUNNEL.

1° ABSORPTION. — Dans des tubes centrifugeurs, on introduit :

	TUBE REACTION	TUBE TEMOIN
Extrait végétal pur	0 cm ³ 2	0 cm ³ 2
Extrait de rein de cobaye	0 cm ³ 8	
Eau salée à 9 %		0 cm ³ 8

Dans 2 tubes on introduit de même :

	TUBE REACTION	TUBE TEMOIN
Extrait végétal dilué à 1/10.....	0 cm ³ 2	0 cm ³ 2
Extrait de rein de cobaye	0 cm ³ 8	
Eau salée à 9 %		0 cm ³ 8

Les tubes sont bouchés et maintenus, en agitant de temps à autre, à la température du laboratoire. Au bout de 2 heures on les centrifuge.

2° AGGLUTINATION. — Les liquides surnageants des 4 tubes précédents sont recueillis et dilués de proche en proche par la méthode habituelle, en 4 séries de 12 tubes pour chacun d'eux. Dans chaque série, on ajoute volume égal d'une des suspensions globulaires. Après agitation et séjour d'une heure à 37°, on procède à la lecture des agglutinations.

3° RÉSULTATS. — Ils sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Interprétation :

Le contact avec une préparation riche en antigène de Forssman détermine une chute très sensible du taux d'agglutination de l'extrait de *Phaseolus vulgaris* L. L'importance de cette chute, la valeur de l'abaissement du taux des agglutinines restent identiques quelle que soit la catégorie des globules humains auxquels on s'adresse pour explorer le phénomène.

Nous avons répété l'expérience sur un extrait dilué à 1/4 avant la mise en contact avec l'antigène, nous avons prolongé le temps d'absorption jusqu'à 6 heures, nous avons utilisé un antigène de provenance différente (Biolyon) : les conclusions qu'on peut tirer des résultats ainsi obtenus sont exactement superposables à celle qui vient d'être formulée.

Par similitude avec la réaction de PAUL et BUNNEL, telle qu'on la pratique en Biologie Clinique, nous avons effectué, en outre, un essai dans lequel l'extrait de *Phaseolus* fut étudié vis-à-vis de globules de mouton (en plus des globules humains) après contact, d'une part, avec l'antigène au rein de cobaye, et d'autre part, avec un extrait de globules de bœuf. L'extrait de globules de bœuf absorbe dans le sérum humain les agglutinines antimouton qui y apparaissent au cours de la mononucléose infectieuse.

Nous avons constaté alors, dans des conditions expérimentales semblables à celles que nous avons déjà précisées, que l'antigène au rein de cobaye fait chuter le pouvoir agglutinant de l'extrait de *Phaseolus* à l'égard des hématies de mouton comme des hématies humaines. Au contraire, l'extrait de globules de bœuf n'altère pas l'activité du *Phaseolus* sur les hématies de l'homme et du mouton. Ceci est d'ailleurs partiellement explicable par le fait que l'extrait de *Phaseolus* pur n'agit pas sur les hématies du bœuf ou du veau, ainsi que le signale WIENHAUS (48) et que nous avons pu le vérifier.

5. Influence sur l'agglutination de la modification du milieu par l'addition de plasma albumine de bœuf ou de « Dextran »

Principe :

A l'instar de ce qui est pratiqué lors de la recherche des agglutinines incomplètes qu'on peut rencontrer dans le sérum de certains sujets sensibilisés au facteur Rh, nous avons soumis à l'action de l'extrait de *Phaseolus* des suspensions de différentes catégories de globules, faites soit en eau physiologique soit en milieu albumineux ou riche en grosses molécules comme le Dextran. En effet, les agglutinines incomplètes qu'on rencontre dans les sérums humains ne manifestent leur activité

sur les globules correspondants qu'en milieu albumineux : l'utilisation de suspensions obtenues par dilution de culot globulaire dans une solution de plasma albumine de bœuf, permet leur mise en évidence, alors qu'une simple suspension dans l'eau physiologique leur est insensible. BONNEL (Rev. hémat., 1951-6-95) a montré qu'on peut remplacer la plasma albumine par le Dextran dans ce genre de mesures.

Il n'était pas absolument impossible d'imaginer que l'absence totale de spécificité du *Phaseolus vulgaris* pouvait n'être qu'apparente, et qu'à côté d'agglutinines polyvalentes directement accessibles, quelque agglutinine incomplète n'allait pas conférer à cette espèce une importance biologique égale aux représentants privilégiés de la même tribu, comme *Dolichos biflorus* L. ou *Mucuna urens* D.C.

Matériel :

L'extrait de *Phaseolus*, dilué à 1/5 avant l'emploi ;

Des culots globulaires lavés de sangs des catégories A₁ Rh+, A₂ Rh+, BRh+, ORh+ et ORh— ;

La plasma albumine de bœuf ;

Le Dextran.

Technique :

On dispose 15 galeries de 12 tubes à hémolyse. Dans chaque série on répartit selon la technique habituelle des dilutions progressives de l'extrait ; celui-ci a été dilué à 1/5 pour obtenir à peu près à coup sûr le terme des agglutinations dans les limites des 12 tubes.

On prépare alors des suspensions de chacune des catégories globulaires, à partir de leur culot : 3 gouttes de culot sont versées successivement dans 1 cm³ d'eau physiologique, 1 cm³ de plasma albumine à 1/2, 1 cm³ de Dextran. Chaque variété globulaire existe alors sous 3 formes suivant le milieu salé, albumineux ou Dextran. Comme il y a 5 variétés de globules on obtient ainsi : 15 suspensions qui sont réparties dans les 15 galeries de tubes, à raison d'une goutte par tube. Après agitation, on laisse en repos 2 heures à la température ordinaire et on lit les taux d'agglutination.

Résultats :

Les limites d'agglutination, exprimées par rapport à l'extrait pur, sont les suivantes :

MILIEU	PHYSIO-LOGIQUE	ALBUMINE	DEXTRAN
Globules A ₁ Rh +	1/1280	1/2560	1/2560
— A ₂ Rh +	1/1280	1/1280	1/2560
— B Rh +	1/1280	1/2560	1/1280
— O Rh +	1/1280	1/2560	1/1280
— O Rh —	1/1280	1/2560	1/2560

CONCLUSION :

On constate d'abord l'égalité de puissance, en milieu physiologique, vis-à-vis des 5 catégories d'hématies : ceci n'est qu'une confirmation du résultat déjà rapporté précédemment.

Ensuite on peut remarquer d'une façon générale que les taux obtenus en milieux albumineux ou macromoléculaire diffèrent peu des autres. Quand la différence existe, elle ne dépasse pas la valeur d'un tube, et se fait toujours au profit du milieu enrichi et aux dépens du milieu salin. Il n'y a donc pas d'agglutinine spécialement décelable en milieu particulier, et rien qu'on puisse rapprocher d'une agglutinine incomplète.

Toutefois, la tendance modérée mais nette qu'a l'agglutinine à agir mieux en milieu albumineux ou macromoléculaire qu'en milieu salin s'explique par un phénomène qu'on observe en cours d'expérience : les tubes contenant les émulsions en plasma albumine et en Dextran s'agglutinent plus rapidement que les autres en milieu salin ; dès la première demi-heure on peut lire à l'œil nu des taux d'agglutination très proches de ceux qui seront lus en définitive, alors qu'en milieu salin, seuls les tous premiers tubes sont positifs après ce délai. Et pour nous, les quelques différences de taux observées ne traduisent qu'une accélération du phénomène en présence de plasma albumine ou de Dextran. Il suffit d'attendre d'ailleurs un temps suffisant pour voir les taux se stabiliser à des niveaux semblables ; après 12 heures, en effet, la lecture des agglutinations donne les chiffres suivants :

MILIEU	PHYSIO-LOGIQUE	ALBUMINE	DEXTRAN
Globules A ₁ Rh +	1/2560	1/5120	1/5120
— A ₂ Rh +	1/2560	1/5120	1/5120
— B Rh +	1/1280	1/5120	1/2560
— O Rh +	1/2560	1/5120	1/5120
— O Rh —	1/2560	1/5120	1/2560

6. Action du formol dilué sur l'agglutinine du *Phaseolus*

L'étude du *Phaseolus Limensis* var. *limeanus* a montré à BOYD et REGUERA (6) que certains échantillons, à côté de leur activité vis-à-vis des globules A, pouvaient agglutiner, faiblement, les globules B, et que cette agglutinine, pour ainsi dire parasite, disparaissait par l'action du formol dilué à 37°, exactement comme une toxine se modifie dans ces conditions en un produit d'activité différente, l'anatoxine.

C'est pourquoi nous avons soumis l'extrait de *Phaseolus vulgaris* L. à l'action du formol : 10 cm³ d'extrait frais, obtenu à 37°, sont additionnés d'une goutte de solution commerciale de formol à 40°. Le flacon bouché est maintenu 45 jours à l'étuve, à 37°. Au bout de ce temps, l'extrait ainsi conservé est titré en présence de suspensions globulaires équivalentes, des groupes O Rh+, A₁ Rh+, A₂ Rh+, B Rh+ et O Rh— ; on ne constate alors aucune différence dans l'action de l'extrait vis-à-vis des diverses catégories globulaires.

On peut donc en conclure que le formol dilué, à 37°, n'est pas susceptible de sélectionner dans l'activité multiple de l'extrait de *Phaseolus* une agglutinine relativement spécifique, comme il le fait pour certains extraits de *Phaseolus Limensis*.

Toutefois, les travaux de WIENHAUS (48) permettent de formuler une hypothèse quant à l'action du formol. L'auteur allemand, en effet, soumettant une solution de Phasine au formol à une concentration finale de 1/8° constate qu'après 3 jours aucune altération ne s'est manifestée dans l'activité agglutinante. Mais si le contact se poursuit 3 semaines, WIENHAUS ne retrouve plus aucune activité de sa Phasine quand il l'essaye sur les hématies de lapin.

Dans notre expérience, la concentration en formol est infiniment plus faible, et malgré la longue durée de contact, nous n'avons observé qu'une baisse d'activité assez discrète, de l'ordre de 3 ou 4 tubes.

Dans l'expérience de BOYD et REGUERA, le contact est court : une nuit. Mais les concentrations en formol ne sont pas précisées et peut-être ont-elles été suffisantes pour faire disparaître la très faible agglutinine anti B, sans altérer de façon visible l'agglutinine principale beaucoup plus concentrée.

De toute manière, il est à noter que le formol, à des doses suffisantes, entraîne une volumineuse précipitation au sein de l'extrait de *Phaseolus*, avec inactivation du liquide surnageant.

7. Recherche d'un pouvoir hémolytique de l'extrait de *Phaseolus*

Simplement mis en présence d'hématies de diverses provenances, l'extrait de *Phaseolus* ne présente aucun pouvoir

hémolytique : par analogie avec la sérologie classique, il nous a paru normal de rechercher si l'addition de complément au mélange n'était pas susceptible de révéler une hémolysine.

Matériel :

L'extrait frais de Phaseolus ;

Solution de complément à 1/20^e, obtenue à partir d'un mélange de sérums de cobayes mâles prélevés à jeun, conservé en milieu hypertonique de RONCHESE ;

Hématies de mouton lavées.

Technique :

Nous avons procédé en mélangeant sous volume constant soit des doses variables de globules à des quantités fixes d'extrait et de complément, soit des doses variables d'extrait à des quantités fixes de complément et de globules :

PREMIER ESSAI :

N° DES TUBES	1	2	3		4	5	6
Complément à 1/20 ^e .	0,6	0,6	0,6		0,6	0,6	0,6
Extrait de Phaseolus pur	0,6	0,6	0,6	Extr. à 1/5 ^e	0,6	0,6	0,6
Globules de mouton :							
à 5 %	0,6				0,6		
à 1 %		0,6				0,6	
à 0,2 %			0,6				0,6

DEUXIÈME ESSAI :

N° DES TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dilution de l'extrait	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Volume d'extrait ..	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Complément à 1/20	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Globules de mouton à 5 %	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

En aucun cas, après 30' d'étuve, nous n'avons constaté d'hémolyse.

8. *Comparaison de l'agglutinine végétale avec une agglutinine virale*

L'étude comparée des hémagglutinines du *Phaseolus vulgaris* et du virus de l'influenza a montré à BOURDILLON (4) une parenté entre les deux, confirmée par le pouvoir d'inhibition que manifestent vis-à-vis de l'agglutinine végétale certains sérums d'animaux immunisés contre l'influenza A. Nous avons procédé à quelques essais dans cet ordre d'idées et recherché l'action éventuelle sur l'agglutinine du *Phaseolus* d'un sérum de cheval immunisé contre le virus A de l'influenza.

Nous disposons, grâce à l'amabilité de M. Fauconnier, du laboratoire de la grippe de l'Institut Pasteur de Paris, d'un sérum de cheval titrant, par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, 1/5120° et d'un sérum de cheval de titre O servant de témoin.

Ces deux sérums ont été mis au contact, pendant 2 heures, à 37°, d'un volume égal d'extrait de *Phaseolus* pur ou dilué au dixième. Après centrifugation des tubes où ces mélanges avaient été pratiqués, le titrage des liquides surnageants n'a montré aucune différence entre l'extrait, pur ou dilué, traité par le sérum immunisé, et l'extrait, pur ou dilué, traité par le sérum normal.

Cet essai s'étant ainsi révélé négatif, nous avons cherché à introduire les sérums étudiés dans une réaction de protection, exactement comme nous l'avions fait, sans succès d'ailleurs, pour les sérums anti-*Phaseolus*. Nous avons opéré dans les conditions techniques exposées p. 96, en utilisant des globules humains O Rh+, les sérums de chevaux et l'extrait de *Phaseolus* : ici aussi, aucune inhibition ne s'est manifestée, et les hématies mises au contact du sérum immunisé se sont montrées aussi sensibles à l'extrait végétal que celles qui avaient été traitées par le sérum de cheval normal.

Dans nos conditions expérimentales et en précisant bien l'espèce végétale qui nous a servi de source d'agglutinine, nous aboutissons à la négation de rapports sérologiquement décelables entre les agglutinines du virus de l'influenza A et du *Phaseolus vulgaris*.

9. *Action sur quelques suspensions microbiennes*

Certains suc d'origine végétale, obtenus par exemple par expression, exercent une action agglutinante sur des émulsions de microbes : ainsi le suc du fruit d'*Olea Europea*, selon DIACONO et MASSA (12), agglutine les suspensions de germes du

groupe typhique-paratyphique, le colibacille, les bacilles dysentériques, le proteus X19, MARCHAL (31-32) et ses élèves ont rencontré une propriété identique à l'égard du proteus X19 et du bacillus prodigiosus chez Echeveria gibbiflora.

Cette propriété particulière a été rapportée par les auteurs aux tanins que contiennent les sucres végétaux. Bien que l'extrait de Phaseolus ne donne pas de coloration avec le Perchlorure de Fer, bien que son pouvoir hémagglutinant ne diffuse pas au travers des membres de collodion, la connaissance des phénomènes que nous venons de rappeler nous a incité à soumettre à son action quelques suspensions bactériennes : ces suspensions étaient soit des suspensions standard dont nous préciserons la provenance, soit des suspensions obtenues au laboratoire et amenées à la même densité optique que les suspensions typhiques H délivrées par l'Institut Pasteur. Ces émulsions, mélangées à l'extrait de Phaseolus à des concentrations allant de 1/5 à 1/500, ont été examinées après 2 heures à 37° et 18 heures à température ordinaire. Nous n'avons observé aucune modification des suspensions mises en jeu, à savoir :

- Staphylocoque doré ;
- Entérocoque ;
- Colibacille ;
- Bacille pyocyane ;
- Bacille typhique O et H (Institut Pasteur) ;
- Bacille para A, O et H (Institut Pasteur) ;
- Bacille para B, O et H (Institut Pasteur) ;
- Bact. tularensis (Institut Pasteur) ;
- Bac. melitensis (C. R. F. O. Montpellier) ;
- Bac. dysentérique Shiga (Biolyon) ;
- Bac. dysentérique Flexner (Biolyon).

Il n'y a donc pas d'action antibactérienne de l'hémagglutinine du Phaseolus vulgaris.

II. — ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS D'ANTISÉRUMS EXPÉRIMENTAUX OBTENUS A L'AIDE DE L'EXTRAIT VÉGÉTAL

1° *Obtention des antisérums*

Le but que nous poursuivons est de provoquer chez un lapin, par des injections répétées, l'apparition d'anticorps antagonistes de l'agglutinine végétale, exactement comme on obtient un sérum antitoxique en vaccinant l'animal par des doses progressives d'une toxine, plus ou moins modifiée. Mais d'em-

blée se pose le problème de l'antigène qui va servir à cette vaccination : *à priori*, c'est à l'agglutinine que nous désirons faire jouer ce rôle. Encore faut-il que nous puissions l'utiliser à l'état pur, et qu'elle manifeste des propriétés antigéniques : WIENHAUS (48) avait tenté la vaccination d'un lapin avec sa Phasine préalablement chauffée et filtrée : il n'obtint aucun résultat, contrairement à CORNEVIN qui avait opéré ainsi avec la Ricine, et dont il ne put reproduire les résultats. Au cours des essais concernant la toxicité de sa préparation, l'auteur allemand n'a jamais constaté aucune propriété antagoniste des sérums d'animaux sacrifiés après des injections massives. Il est vrai qu'il s'agissait là d'expériences rapides, dépassant rarement 48 heures. Ultérieurement RENKONEN (41) déclare probable le caractère antigénique de l'agglutinine de Vicia Cracca sans en apporter la démonstration décisive : il précise seulement que le sérum de lapin immunisé à l'aide d'agglutinine purifiée contient de puissants anticorps antiVicia mesurés par fixation du complément.

Nous avons mené parallèlement deux immunisations. La première, à l'aide d'extrait végétal brut, nous a permis d'obtenir, ainsi que nous le verrons, un sérum qui neutralise les propriétés agglutinantes de l'extrait ; mais il ne s'ensuit pas automatiquement qu'on doive assimiler l'agglutinine à un antigène, car, noyée au sein des autres constituants de l'extrait, et en particulier, des protéines, elle a pu se comporter comme un haptène, c'est-à-dire comme une substance non antigénique, mais contre laquelle on peut obtenir des antisérums si l'on prend soin de l'injecter, mélangée à des protéines étrangères. Dans le cas présent il est possible que l'agglutinine, au milieu des protéines végétales de l'extrait, n'ait eu que la valeur d'un haptène.

C'est pourquoi il importait de rechercher si un antisérum de propriétés identiques au précédent pouvait être obtenu à l'aide de l'agglutinine seule. Renonçant aux méthodes de purification physicochimiques, comme celle de RENKONEN, nous avons tenté d'utiliser la faculté de l'agglutinine de se fixer sur les hématies pour l'extraire de son milieu complexe. Comme il était contre indiqué d'utiliser des hématies étrangères, ce sont les propres hématies du lapin destiné à l'injection, qui ont servi de piège si l'on peut dire, à l'agglutinine : le sang de l'animal, prélevé sur héparine, est additionné d'un égal volume d'extrait. Le mélange, après agitation, séjourne 2 heures à 37°. Il se forme un gros coagulum qui est lavé à 3 reprises à l'eau salée, dans un tube centrifugeur. A chaque lavage, on le dissocie le mieux possible avec un agitateur, avant la centrifugation. C'est le produit du dernier lavage ainsi dissocié qui sert à

l'inoculation : il va sans dire que nous avons dû nous contenter dans ce cas de la voie intrapéritonéale, et rejeter la voie intraveineuse.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL :

1. *Lapin Ph* : inoculé à l'aide d'extrait brut.

DATES (jour)	DOSES EN CM ³	VOIE
—	—	—
1	3	Intrapéritonéale
4	3	—
8	3	—
12	4	—
15	6	—
17	6	—
20	2	Intraveineuse
22	3	—
24	4	—
27	5	—
34	2	—
41	Prélèvement de sang par ponction cardiaque	

2. *Lapin G.* : inoculé à l'aide d'agglutinine absorbée sur des hématies.

Le jour de chaque injection, on prélève sur héparine, du sang dans la veine marginale de l'oreille de l'animal, on l'additionne d'un égal volume d'extrait brut. Après agitation et séjour à 37° dans un tube centrifugeur bouché, pendant 2 heures, le mélange est centrifugé. On lave le culot 3 fois à l'eau salée, en ayant soin chaque fois de le dissocier. Après le dernier lavage, le culot est remis en suspension dans son volume d'eau salée et injecté dans le péritoine du lapin :

DATES (jour)	DOSES EN CM ³ D'EXTRAIT UTILISÉ
—	—
1	1
5	1.5
5	4
9	1
13	5
16	7
18	10
25	5
32	Prélèvement de sang par ponction cardiaque

Les 2 sérums Ph et G, séparés après coagulation du sang, sont additionnés de Sunoxol et conservés au réfrigérateur à -15° .

Incidents :

Les inoculations, bien que pratiquées sans précautions d'asepsie, n'ont donné lieu qu'aux incidents suivants :

— les injections dans le péritoine sont parfois suivies d'une induration locale qui disparaît peu à peu ;

— les injections intraveineuses, quand une faute technique entraîne du liquide hors de la veine, peuvent s'accompagner d'escarrhes qui rétrocedent par simple badigeonnage au mercurochrome.

2° Flocculation de l'extrait de Phaseolus par les antisérums

Il est naturel de considérer comme une preuve fondamentale de l'immunisation des animaux l'existence d'un pouvoir flocculant de leurs sérums pour l'extrait qui a servi d'antigène, et la disparition de l'agglutinine au cours de cette flocculation.

Principe :

Mettre en contact à des dilutions variées les sérums et l'extrait, et observer la présence ou non d'un précipité. Rechercher ensuite dans les liquides surnageants la persistance du pouvoir agglutinant de l'extrait initial. Il est à noter qu'on retrouve ici une difficulté déjà signalée : l'action agglutinante des sérums de lapins vis-à-vis de nombreuses suspensions globulaires. Cet écueil s'évite simplement en utilisant des hématies de lapin dans la recherche de l'agglutinine.

Matériel :

Les 2 sérums Ph et G ;

L'extrait de *Phaseolus vulgaris* ;

Une suspension d'hématies lavées de lapin normal à 5 %.

Technique :

On dispose 2 séries de 10 tubes à hémolyse. Dans la première série on introduit :

0 cm³ 2 d'extrait de *Phaseolus* pur dans le premier tube ;

0 cm³ 2 d'extrait de *Phaseolus* dilué à 1/10 dans le deuxième ;

0 cm³ 2 d'extrait de *Phaseolus* dilué à 1/100 dans le troisième, etc... On ajoute dans chaque tube de cette première série 0 cm³ 2 de sérum Ph.

On opère d'une façon parallèle pour les tubes de la deuxième série, dans lesquels on introduit 0 cm³ 2 d'extrait à des dilutions croissantes, puis 0 cm³ 2 de sérum G.

Les 2 séries de tubes sont agitées et maintenues à 37° : après 2 heures on constate dans certains tubes la présence d'un trouble témognant d'une floculation de l'extrait par les anticorps du sérum. Ces tubes, après lecture macroscopique de la floculation, sont abandonnés encore 24 heures à température ordinaire, puis centrifugés. Les liquides surnageants décantés individuellement dans des tubes propres sont additionnés chacun d'une goutte de la suspension d'hématies de lapin pour rechercher la persistance ou la disparition du pouvoir agglutinant après l'action des antisérums. Au bout d'une heure à 37°, on lit les résultats d'agglutination, en ayant soin de les comparer à ceux obtenus avec des dilutions d'extrait ayant subi, après simple mélange avec un égal volume d'eau salée, les séjours de 2 heures à 37°, puis de 24 heures à température ordinaire.

Résultats :

Ils sont rapportés dans le tableau suivant où l'intensité des floculations comme celle des agglutinations est notée par les signes +

Dilution de l'extrait mis à flo-culer	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Floculation par le sérum Ph.	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0
Pouvoir agglutinant du liquide surnageant	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Floculation par le sérum G.	+++	+++	+	0	0	0	0	0	0	0
Pouvoir agglutinant du liquide surnageant	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoin agglutinant par extrait seul	+++	+++	+++	+++	++	0	0	0	0	0

CONCLUSION :

On constate :

1° Que les antisérums ont un pouvoir flocculant vis-à-vis de l'extrait de *Phaseolus* : le sérum obtenu à l'aide d'extrait brut, ou sérum Ph, floccule l'extrait dilué jusqu'à 1/10.000 ; le sérum G, obtenu avec les globules revêtus d'agglutinine n'agit sur l'extrait que si sa dilution ne dépasse pas 1/100 ;

2° Que la floculation ainsi réalisée fait disparaître les propriétés agglutinantes, sous réserve d'opérer entre certaines marges de concentrations : ainsi le sérum Ph pur permet de neutraliser un volume égal d'extrait de *Phaseolus* dilué au 1/10.

3° *Application de la technique d'hémagglutination passive à l'étude de l'extrait de Phaseolus et de son antisérum*

Principe :

La sérologie utilise dans certains cas des réactions dites de protection qui permettent de révéler indirectement la présence d'anticorps dans un sérum. Ces réactions, dont le type est celle de DUBOS MIDDLEBROOK (44) utilisée dans la tuberculose, consistent à tenter de revêtir des hématies d'un antigène donné, afin qu'en présence d'un sérum contenant l'anticorps spécifique de cet antigène, la fixation antigène-anticorps entraîne dans la suspension globulaire une agglutination, témoin directement perceptible de la réaction.

Nous avons appliqué aux sérums expérimentaux contenant des antiagglutinines cette réaction de protection, mais d'une façon inverse à celle qui s'utilise normalement. En effet, dans notre cas, l'antigène est lui-même agglutinant puisqu'il s'agit de l'extrait de *Phaseolus*. Il n'est donc pas question de tenter d'en revêtir des hématies pour les introduire ensuite dans une réaction d'agglutination. Au contraire, c'est l'anticorps, c'est-à-dire l'antisérum expérimental, dont nous nous servons pour protéger des hématies que nous soumettons ensuite à l'action de l'extrait végétal antigène. La protection, si elle a lieu, peut alors s'exercer dans l'un des deux sens suivants

ou bien comme dans la réaction Dubos-Middlebrook, l'union antigène-anticorps entraîne l'agglutination ;

ou bien l'anticorps enrobant les globules les soustrait à l'action de l'agglutinine de l'antigène et la réaction s'objective alors par l'absence d'agglutination.

Matériel :

L'extrait de *Phaseolus* ;
Les antisérums G et Ph ;

Du sang de lapin normal recueilli sur héparine (5 mg. pour 10 cm³).

Technique :

Nous l'avons bâtie sur le même mode que celle qu'on utilise chez les tuberculeux.

Le sang du lapin normal est centrifugé, et le culot globulaire est lavé 3 fois à l'eau salée. Il est ensuite traité en 3 lots :

A. 2 gouttes de culot globulaire sont ajoutées à 20 gouttes de sérum Ph additionnées de 20 gouttes d'eau salée à 9°/°°. Le tube, bouché, est maintenu 2 heures au bain-marie à 37°, et agité de temps en temps.

B. Mêmes opérations qu'en A, mais avec le sérum G au lieu du sérum Ph.

Les 2 tubes après leur séjour au bain-marie sont centrifugés, les culots hématiques sont lavés à 3 reprises avec 3 cm³ et repris finalement par 4 cm³ d'eau salée : on obtient ainsi des suspensions globulaires à 1/80.

C. 2 gouttes de culot globulaire sont diluées dans 4 cm³ d'eau salée.

On dispose dans ces conditions de 3 suspensions globulaires à 1/80° : l'une A, de globules mis au contact de l'antisérum Ph, l'autre, B, de globules mis au contact de l'antisérum G, la 3^e, C, de globules non traités, et servant de témoin.

On installe alors 3 galeries de 24 tubes à hémolyse : on introduit dans chacune d'elles, sous un volume fixe de 0 cm³ 3, des dilutions progressives d'extrait de Phaseolus : 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, etc., puis on ajoute dans chaque tube 2 gouttes d'une des suspensions globulaires précédemment obtenues :

Suspension A pour la première galerie ;

Suspension B pour la deuxième ;

Suspension C pour la troisième.

Après agitation, les tubes sont placés 1 heure à 37°, après quoi on lit les taux d'agglutination.

Résultats :

La limite d'agglutination apparaît indentique dans les 3 séries et située au 15° tube, c'est-à-dire à 1/16.000°.

CONCLUSION :

Il est permis de penser que l'identité des résultats dans les 3 catégories de globules : normaux, traités par le sérum Ph, traités par le sérum G, constitue la preuve que le contact avec

les antisérums n'a en aucune façon modifié la sensibilité des globules à l'agglutinine, et qu'aucun phénomène de protection n'a eu lieu.

Comme il est possible que l'absence de protection tienne à un contact insuffisant des globules avec l'antisérum, nous nous sommes adressés, dans un essai complémentaire au lapin Ph lui-même, 15 jours après sa dernière inoculation, pour utiliser ses globules, au lieu des globules d'un lapin normal : les siens, en effet, à l'époque où nous opérons, ne manquaient pas d'être en contact permanent avec les anticorps circulants et il nous suffisait de les laver pour avoir la suspension globulaire correspondant à A dans la première partie de l'expérience.

La réaction, menée ainsi avec ces globules incubés *in vivo* au sein de l'antisérum, nous a conduit finalement à un taux limite d'agglutination du même ordre que celui obtenu avec des globules normaux traités parallèlement, et que ceux rapportés précédemment.

Nous pouvons donc conclure que même dans des conditions spécialement favorables de contact globules-antiagglutinine, il ne semble pas que se fasse à la surface de ceux-là un revêtement les protégeant contre une action ultérieure de l'extrait végétal.

4° *Utilisation d'hématies tannées pour l'hémagglutination passive.*

Après BOYDEN qui l'a préconisée, BORDUAS et GRABAR (3) ont mis en œuvre la méthode d'hémagglutination passive en présence d'hématies tannées pour étudier des systèmes antigène-protidique-anticorps homologue. Alors que les réactions du type MIDDLEBROOK-DUBOS permettent la mise en évidence d'antigènes polyosidiques capables de se fixer directement sur les hématies, la modification apportée par BOYDEN étend cette possibilité aux antigènes protidiques : il suffit pour cela de traiter préalablement des hématies par une solution diluée d'acide tannique. Ces hématies, ainsi tannées, deviennent alors aptes à absorber des antigènes protidiques. Mais les hématies tannées sont fragiles et il importe de suivre un mode opératoire précis, établi par BORDUAS et GRABAR. C'est celui que nous décrivons :

Matériel :

L'extrait de Phaseolus ;

L'antisérum Ph décomplémenté, dilué à $1/10^6$;

Des globules de mouton récents ;

L'acide tannique pur : tannin purifié à l'alcool RP en solution à 1/20.000^e dans l'eau salée à 9 ‰ ;

Des solutions tampons isotoniques ;

solution tampon n° 1 à pH 6,4 tampon n° 2 à pH 7,2

P04 H₂K 0,15 M 28 cm³ 12

P04 HNa₂ 0,15 M 12 cm³ 28

Eau salée à 9 ‰ 40 cm³ - 40

Une solution de Subtosan (isotonique à 3,5 p. 100) diluée à 1/10^e dans de l'eau physiologique.

Technique :

A. — Traitement des globules.

Lavage par centrifugation à faible vitesse, à 3 reprises dans l'eau physiologique, en maintenant le volume initial. Ces globules ainsi lavés sont dilués à 2,5 p. 100 dans du tampon pH 7,2 : un volume de cette suspension est alors mis en contact pendant 15 minutes avec un égal volume de solution d'acide tannique, à température ordinaire. Le mélange est alors centrifugé doucement pendant 5' et le culot globulaire est lavé à deux reprises à l'aide de tampon pH 7,2, puis les globules sont finalement remis en suspension dans un volume d'eau physiologique.

Cette suspension de globules ainsi tannés est traitée par 4 volumes de solution antigénique : après les essais infructueux où l'antigène, trop concentré, agissait par son agglutinine sur les globules, nous avons adopté une solution à 1/3.000^e dans le tampon pH 6,2 d'un extrait de *Phaseolus* dont l'activité titrée préalablement dans nos conditions habituelles était d'1/2.000^e environ. Après 25 minutes à température ordinaire, ce mélange, globules tannés-antigène dilué, est centrifugé doucement et le culot lavé deux fois dans un volume de subtosan au 1/10^e. On remet, pour terminer, les globules en suspension dans un volume de cette solution de subtosan, pour obtenir la suspension de globules tannés, puis sensibilisés et lavés, qui va servir à la réaction.

B. — Réaction proprement dite.

Des dilutions croissantes dans du subtosan à 1/10^e du sérum Ph déjà dilué 10 fois sont introduites dans 28 tubes à hémolyse, à raison de 0,5 par tube : on ajoute une goutte de suspension globulaire dans chaque tube.

Deux tubes témoins sont également préparés : l'un avec 0,5 de sérum dilué 1/20^e et une goutte de suspension d'hématies de moutons non traitées ; il rend compte de l'absence dans le

sérum d'agglutinines antimouton ; l'autre avec 0,5 de subto-san à 1/10^e et une goutte de suspension d'hématies traitées ; il sert de comparaison pour la lecture des résultats.

Après agitation modérée, les tubes sont abandonnés une nuit à température ordinaire.

Résultats :

Les tubes sont examinés avec précaution pour ne pas être agités, au miroir concave : dans le tube témoin, les hématies sont déposées en anneau assez net. Il en est ainsi des derniers tubes de la série, cependant que les premiers présentent un aspect différent avec un dépôt en pellicule grenue couvrant régulièrement le fond du tube, qui est le signe d'une réaction positive. La limite de la positivité est située dans ces conditions au 12^e tube, soit une dilution du sérum Ph de 1/80.000^e.

Discussion :

Pouvons-nous rapporter à l'agglutinine et à l'anticorps homologue le résultat ainsi obtenu ? Malheureusement non, car nous ne savons pas plus dans le cas présent que précédemment si nous pouvons dissocier l'agglutinine d'autres substances antigéniques contenues dans l'extrait, et l'anticorps anti-agglutinine des anticorps homologues de ces antigènes non précisés.

Tout au plus, sommes-nous dans le droit de dire que l'étude du couple extrait de Phaseolus-antisérum homologue par les réactions d'hémagglutination passive de MIDDLEBROOK-DUBOS et selon BOYDEN montre que c'est de préférence sur les hématies tannées que les substances antigéniques de l'extrait aiment à se fixer et que par conséquent il s'agit plutôt de substances protidiques que de polysides.

5° Action d'un antisérum sur un sérum humain riche en anticorps hétérophiles de Forssman

Il nous a été donné d'avoir en mains le sérum d'un sujet ayant reçu 6 jours auparavant de fortes doses de sérum anti-diphthérique en injections. Un tel sérum se révèle, on le sait, doué d'un pouvoir agglutinant vis-à-vis des hématies de mouton. Ce pouvoir est lié à des anticorps hétérophiles car il disparaît quand on maintient le sérum au contact d'un extrait de rein de cobaye : c'est ce qui permet dans la réaction de PAUL et BUNNEL de le distinguer des agglutinines développées au cours de la mononucléose infectieuse, et qui sont absorbables par un extrait d'hématies de bœuf et non par l'extrait de rein de cobaye.

Nous avons dans ces conditions cherché à étudier l'action sur ce sérum riche en anticorps de Forssman, du sérum anti-phaseolus ou sérum Ph : dans le cas d'une relation entre la phytoagglutinine et le système de Forssman, il est permis de penser que le sérum Ph allait neutraliser au moins en partie les agglutinines du sérum humain. Au contraire, une indifférence entre les deux éléments mis en présence devait nous apporter un argument pour séparer la phytoagglutinine du système de Forssman.

Matériel :

Le sérum d'un sujet ayant reçu dans la semaine précédente de fortes doses de sérum antidiphthérique. Ce sérum est chauffé à 56° pendant 30', avant l'emploi ;

L'antisérum Ph ;

Des globules de mouton frais et lavés.

Technique :

Il est nécessaire d'absorber d'abord les agglutinines anti-mouton que peut contenir le sérum de lapin Ph, pour éviter qu'elles n'interfèrent dans la réaction. Dans ce but le sérum Ph est additionné de 2 gouttes de culot globulaire de mouton pour 3 cm³. Après 20' de contact avec agitation, le mélange est centrifugé et le sérum surnageant, décanté, est à nouveau additionné de 2 gouttes de culot globulaire. Après 20', on centrifuge à nouveau et on sépare le sérum Ph prêt à l'emploi.

Dans 3 tubes à Hémolyse, on introduit les 2 sérums à des dilutions finales différentes, grâce à l'addition d'eau salée, ainsi qu'il ressort du tableau suivant :

TUBES	1	2	3
Sérum Ph	0,5	0,1	0,5
Sérum humain ..	0,5	0,5	0,1
Eau salée		0,4	0,4

Les 3 tubes sont agités et abandonnés 2 heures à 37°. En même temps on procède à l'absorption des agglutinines du sérum humain par l'extrait de rein de cobaye, en mélangeant dans un tube n° 4 0 cm³ 2 du sérum à 0 cm³ 8 d'extrait de rein de cobaye. Le tube est laissé 2 heures à température du laboratoire.

Les 4 tubes sont alors centrifugés, et les liquides surnageants en sont dilués de proche en proche selon la technique

habituelle. On dilue de même le sérum humain non modifié pour connaître le titre initial des agglutinines. Dans chacun des tubes de toutes ces dilutions contenant 0 cm³ 4 de liquide, on ajoute une goutte de suspension globulaire de mouton à 20 %.

Résultats :

Après 2 heures de contact à température ordinaire, on lit les taux d'agglutination que voici, rapportés au sérum humain pur mis en jeu :

1° Le sérum humain au départ agglutinine à 1/2048 ;

2° Ce même sérum n'agglutine plus après absorption par le rein de cobaye ;

3° Le sérum humain, après contact avec l'antisérum Ph, dans les conditions du

tube 1, agglutine à 1/512 et non à 1/1024

tube 2, agglutine à 1/512 et non à 1/1024

tube 3, agglutine à 1/320 et non à 1/640

CONCLUSIONS :

Sous l'influence du sérum antiphaseolus, les agglutinines antimouton, apparues dans un sang humain à la suite d'une sérothérapie intensive, subissent *in vitro* une chute modérée de leur taux d'activité.

Ce résultat doit être rapproché de l'action déjà signalée de l'extrait de rein de cobaye sur l'agglutinine végétale dont elle abaisse le titre assez notablement : nous avons là deux arguments en faveur d'un certain degré de parenté entre la phytoagglutinine et le système de Forssman.

6° *Action des antisérums sur les sérums agglutinants humains anti A et anti B*

Pour déceler une éventuelle parenté entre l'agglutinine du Phaseolus et les isoagglutinines humaines correspondant aux agglutinogènes A et B, nous mettons en présence un des antisérums expérimentaux qui, nous venons de le voir, sont capables de neutraliser l'hémagglutinine du haricot, et des sérums humains anti A et anti B ; le titre de ces sérums est étudié avant et après le contact avec le sérum antiphaseolus.

Matériel :

Le sérum Ph ;

Des sérums anti A, anti B et anti D humains, provenant du centre de transfusion de Toulouse ;

Des suspensions d'hématies A et B lavées, à 5 %.

Technique :

Il est nécessaire au départ de faire disparaître l'activité du sérum Ph, en tant que sérum de lapin, vis-à-vis des hématies humaines. Dans ce but, on laisse 1 cm³ de sérum au contact de 2 gouttes de culot globulaire A2 pendant 20' à température ordinaire. Après centrifugation, le sérum surnageant subit un deuxième traitement identique au premier et est prêt à l'emploi. On opère de même à l'aide d'hématies du groupe B. On répartit alors les éléments de la réaction en 6 tubes selon le tableau suivant :

N° DES TUBES	1	2	3	4	5	6
Sérum Ph absorbé par globules A2	1				1	
Sérum Ph absorbé par globules B			1			
Sérum anti A	1	1				
Sérum anti B.....			1	1		
Sérum anti O					1	1
Eau salée à 9 %		1		1		1

On a ainsi pour chaque type de sérum agglutinant 2 tubes, l'un dans lequel s'établit le contact avec l'antisérum Ph, l'autre où le sérum est simplement amené à une dilution équivalente par de l'eau salée. Les tubes, agités, sont abandonnés à l'étuve 1 heure à 37°. Au sortir de l'étuve, aucune modification macroscopique n'est perceptible. Les tubes sont cependant centrifugés et les liquides provenant de cette centrifugation sont titrés par dilutions successives, en présence des suspensions d'hématies homologues des sérums. Les suspensions sont employées à raison de une goutte pour 0 cm³ 4 de dilution.

Après une heure trente de contact, on peut lire les résultats suivants :

Tubes 1 et 2 : même pouvoir agglutinant, de 1/512° ;

Tube 3 : agglutination à 1/64° ;

Tube 4 : agglutination à 1/256° ;

Tubes 5 et 6 : même pouvoir agglutinant, de 1/8° ;

CONCLUSION :

Vis-à-vis des sérums anti A et anti O, le sérum anti-Phaseolus ne manifeste pas d'activité dans les conditions où il a été employé. Vis-à-vis du sérum anti B, il manifeste une activité très discrète, mais que nous croyons cependant devoir noter car la répétition de l'expérience avec des sérums de provenance différente nous a conduits au même résultat.

Un problème analogue a été envisagé par KRUPPE et POWILLEIT (25) : ces auteurs allemands ont immunisé des souris à l'aide d'extrait de *Cytisus laburnum* alp., mais faute de sérum en quantité suffisante, ont dû se contenter de vérifier l'inhibition exercée sur l'activité anti O de l'extrait.

7° *Action de l'antisérum Phaseolus
sur différents extraits végétaux*

L'action inhibitrice précédemment établie du sérum anti-Phaseolus à l'égard de l'extrait de haricot ayant servi à son obtention n'a rien qui puisse surprendre. Mais il est, *à priori*, intéressant de rechercher si des agglutinines autres que celle du Phaseolus sont susceptibles d'inhibition par ce sérum, ce qui établirait entre ces agglutinines et celle du Phaseolus une parenté immunologique étroite. Nous avons soumis, dans ce but, à l'action de l'antisérum Ph des extraits frais de *Vicia Cracca*, *Dolichos biflorus*, *Dolichos lablab*, *Phaseolus lunatus* et *Lathyrus niger* : ces extraits purs ou dilués au 1/10^e sont mélangés à un égal volume d'antisérum Ph, et abandonnés une heure à 37°. Au bout de ce temps, on peut observer macroscopiquement si l'antisérum a déterminé une précipitation dans l'extrait limpide au départ. De toute manière les tubes sont centrifugés et on procède au titrage des agglutinines dans les liquides surnageants. Pour chaque extrait, on prépare parallèlement au protocole précédent un témoin, dans lequel à l'antisérum on substitue de l'eau salée. La comparaison des titres des tubes-réaction et des tubes-témoin permet d'expliciter, le cas échéant, l'action de l'antisérum.

Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats suivants :

NATURE DE L'EXTRAIT	PRECIPITE en présence de l'antisérum	ACTIVITE	
		avant l'action de	après l'antisérum
Phaseolus vulgaris	+++	1/4090	1/128
Vicia Cracca	—	1/512	1/512
Dolichos biflorus	+	1/128	1/128
Phaseolus lunatus	+	1/256	1/256
Lathyrus niger	+	1/256	1/32
Dolichos lablab	+	1/256	1/16

Les semences ainsi étudiées, choisies en fonction de nos disponibilités, réunissent les caractères suivants :

Lathyrus niger : possède une agglutinine aspécifique comparable à celle du *Phaseolus vulgaris*, mais il appartient à une tribu différente (*Viciae*).

Vicia Cracca : également parmi les *Viciae*, possède une agglutinine spécifique.

Dolichos biflorus et *Phaseolus lunatus* : à action spécifique, figurent au contraire dans la tribu des *Phaseolae*, aux côtés du *Phaseolus vulgaris*.

Dolichos lablab : réunit la double condition d'appartenir à la même tribu que le *Phaseolus* et de receler une agglutinine polyvalente.

Il semble que les anticorps développés dans le sang du lapin par injection d'extrait de *Phaseolus vulgaris* L. capables de se combiner à l'agglutinine qu'il contient, sont également susceptibles de s'unir à d'autres agglutinines, même provenant de Papilionacées d'autres tribus, pourvu qu'il s'agisse d'agglutinines aspécifiques comme celles du *Phaseolus vulgaris* ; bien qu'avec une intensité moindre, l'antisérum Ph est, en effet, capable de les neutraliser comme il neutralise l'extrait de *Phaseolus vulgaris*. Au contraire, quand on s'adresse à des plantes à pouvoir agglutinant spécifique, même choisies dans la tribu des *Phaseolae*, leurs extraits se montrent insensibles à l'action de l'antisérum Ph.

On peut donc conclure que l'individualité antigénique des agglutinines est liée, chez les Papilionacées, non pas à la position systématique à l'intérieur de la famille mais à l'absence (et peut-être, pour les autres agglutinines, à la présence) de spécificité.

RÉSUMÉ :

Le comportement immunologique de l'agglutinine du *Phaseolus vulgaris*, tel que nous l'avons envisagé, nous a permis de confirmer son aspécificité rigoureuse vis-à-vis des groupes sanguins humains et d'établir son affinité relative pour certains supports de l'antigène de Forssman ; cette affinité se traduit par l'action de l'extrait de rein de cobaye, et elle est en accord avec les résultats qu'on obtient quand on met l'agglutinine végétale et les agglutinines humaines anti A et anti B en compétition.

L'étude des antisérums obtenus expérimentalement à l'aide d'extrait végétal nous a montré le caractère antigéniquement différent des agglutinines aspécifiques, d'une part, et des agglutinines spécifiques de l'autre.

Le sérum de cheval immunisé contre l'influenza A n'a manifesté aucune action vis-à-vis de l'agglutinine végétale qui nous a ainsi paru distincte de l'héماغglutinine du virus A.

Enfin, l'absence de modifications des suspensions microbiennes soumises à l'extrait de *Phaseolus* sépare l'héماغglutinine du *Phaseolus* des pseudoagglutinines présentes dans certains organes végétaux riches en tanins.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons achevé l'exposé des différents chapitres que nous nous étions proposé de traiter. Avant d'en dégager quelques notions synthétiques et quelques suggestions relatives aux agglutinines de Papilionacées, qu'il nous soit permis de réunir ici les résultats finaux obtenus au cours de ce travail.

La répartition des hém-agglutinines, envisagée en réunissant les résultats actuellement connus pour l'ensemble du règne végétal, n'obéit à aucune loi simple : elle semble le fruit du hasard, encore que quelques groupements végétaux, familles (Papilionacées), tribus (Génistées, Galégées, Viciées, Phaséolées), genres (*Datura*, *Phaseolus*, *Vicia*), sont particulièrement privilégiés. Ceci nous montre qu'il est préférable d'envisager pour le moment l'étude des agglutinines sur un plan plus modeste et c'est pourquoi notre travail s'est poursuivi, au point de vue botanique, par l'analyse du comportement de l'hém-agglutinine d'une espèce bien précisée, de *Phaseolus vulgaris* L. var. *Saxa*.

Le *Phaseolus*, étudié tout au long de sa végétation, n'a révélé d'agglutinine que dans ses graines mûres, au niveau des cotylédons, différant ainsi de certaines *Vicia* dont les feuilles et les tiges en contiennent. La germination de ces semences de *Phaseolus* nous a permis d'observer la corrélation existant entre les cotylédons et les feuilles primordiales qui, à titre transitoire, contiennent de l'agglutinine. Cette agglutinine des feuilles primordiales semble provenir des cotylédons car elle disparaît avec eux et peut se manifester dans l'étage foliaire supérieur si l'on sectionne les feuilles primordiales.

Toujours aux dépens des semences du *Phaseolus vulgaris* var. *Saxa*, nous avons exploré la nature chimique de l'agglutinine : elle nous est apparue comme distincte des tanins responsables de certaines agglutinines végétales, car non dialysable et sans réaction avec le $\text{Cl } 3 \text{ Fe}$.

Sa précipitation par le $\text{SO}_4 \text{ Am}_2$ est totale entre 0,7 et 0,8 de la saturation, mais à des taux inférieurs on la voit déjà précipiter partiellement.

L'électrophorèse enfin, pratiquée sur papier selon le dispositif de MACHEBŒUF, la montre associée à des protéines de

vitesse très lente, inférieure à celle des globulines γ du sérum humain, sans qu'on puisse révéler à son niveau de glucoprotéines neutres.

Pour terminer, c'est l'aspect « immunologique » de l'agglutinine qui nous a retenu : d'abord étudiée directement, soit sur des hématies d'origines diverses, soit par compétition avec les antisérums humains α et β , soit après contact avec l'extrait de rein de cobaye, elle est restée aspécifique, mais elle a montré :

d'une part, une certaine communauté avec le sérum α puisque des hématies bloquées par ce sérum n'absorbaient l'agglutinine végétale que très difficilement ;

d'autre part, une affinité pour l'extrait de rein de cobaye riche en antigène de Forssman.

C'est ensuite les propriétés de sérums expérimentaux obtenus en vaccinant des lapins à l'aide d'extrait de *Phaseolus* qui ont été explorées : la parenté de l'agglutinine végétale avec le système de Forssman s'est alors confirmée, puisque cet anti-sérum abaissait le titre des anticorps hétérophiles d'un sérum humain.

En outre, ces sérums ont permis de séparer les agglutinines spécifiques des agglutinines aspécifiques, puisque seules ces dernières sont inhibées par le sérum anti-*Phaseolus*.

Enfin l'agglutinine du *Phaseolus* n'a présenté dans nos essais aucun point commun avec celle du virus de l'Influenza et s'est montrée inefficace sur les suspensions bactériennes que nous avons pu soumettre à son action.

Malgré ces résultats partiels ou provisoires, malgré les aspects du problème qui n'ont été qu'effleurés dans ce travail, nous tenterons pour terminer d'évoquer quelques interprétations qu'il est possible d'en dégager.

La constitution chimique de l'agglutinine du haricot nous échappe encore et les procédés de purification que nous avons cités n'ont pas la prétention d'aboutir à une substance chimiquement pure. Deux hypothèses ont été retenues, qui font de l'agglutinine une substance protidique.

La première l'assimile à un composé protidique simple, polypeptide ou protéose, qui répondrait des principales propriétés de solubilité, en particulier en présence de solutions salines ; pour expliquer par ailleurs les précipitations partielles de l'agglutinine, qu'on obtient dans ces conditions où une

telle substance devrait rester entièrement soluble, on est obligé de faire appel à un phénomène de facile absorption qui n'est pas démontré.

La deuxième hypothèse attribue à l'agglutinine une structure complexe à laquelle participent une protéine à grosse molécule et un groupement prosthétique plus simple protéose ou polypeptide : la présence de ce dernier conférerait à l'ensemble le pouvoir agglutinant, mais une action dénaturante pourrait dissocier les deux fractions et libérer la protéose active, d'une part, et la protéine, support inerte, d'autre part. Ainsi s'expliquerait le partage de l'activité agglutinante dans deux phases distinctes qu'on observe au cours de certaines précipitations : une partie de l'agglutinine complexe précipiterait sans modification donc en restant active ; une autre partie, par dénaturation, libérerait le groupement prosthétique plus soluble qui resterait dans la phase liquide et la rendrait active elle aussi.

Cette deuxième hypothèse, en présentant l'agglutinine comme une protéine volumineuse dont un des stades de dégradation nous serait accessible, s'accorde avec son comportement dans la plante : chez le *Phaseolus vulgaris*, ainsi que nous avons pu le constater, l'agglutinine apparaît dans la graine en voie de maturation. Elle y est localisée dans les cotylédons. Lors de la germination on peut, en outre, observer sa présence dans les feuilles primordiales pour autant que les cotylédons ne sont pas complètement épuisés. Cette localisation quasi exclusive dans la graine suggère qu'on a affaire à une substance de réserve : or, il est commun pour les réserves protidiques de figurer dans la graine sous la forme condensée et non sous forme de petites molécules trop mobiles.

Dans d'autres espèces telle *Vicia sativa* où nous l'avons constaté, l'agglutinine est décelable dans les feuilles, sans rapport avec la fructification : on peut penser qu'elle s'accumule là par un mécanisme identique à celui de la graine ; on peut penser également que cette agglutinine foliaire n'est peut-être pas strictement superposable à celle de la graine et que, par exemple, elle ne figure que sous la forme réduite du groupement prosthétique : la double synthèse de l'agglutinine dans la graine et dans les feuilles pourrait aboutir : dans la graine à la forme complexe d'une substance de réserve promise à la déshydratation et à l'immobilisme, dans la feuille à la forme partielle, soluble, d'une substance dont l'avenir métabolique est immédiat.

Quelle que soit sa forme réelle, qu'elle soit dans la plante unique ou double, l'agglutinine n'en reste pas moins un mé-

tabolite remarquable par son expression hématologique, son pouvoir à l'égard des globules rouges. Une telle particularité est trop frappante pour une substance d'origine végétale pour qu'on n'évoque pas d'autres dérivés du métabolisme dont le rôle connu dans la plante est sans rapport avec l'intérêt qu'ils offrent par leur activité toxique ou pharmacodynamique : tels sont, par exemple, glucosides et alcaloïdes. Mais parmi ces composés, certains sont spécifiques comme les Aconitines du genre *Aconit* ; d'autres sont au contraire sans liaison étroite avec les groupements végétaux de la systématique morphologique. Malgré la portée limitée que les considérations chimiques n'ont jamais dépassée en matière de classification, nous avons fait une revue de l'ensemble des plantes qui ont servi à la recherche de principes hémogglutinants pour établir la situation exacte des agglutinines par rapport aux unités systématiques et nous savons qu'elle ne nous a apporté aucun résultat cohérent.

Quelle est alors leur valeur véritable dans la plante ? Nous ne voulons pas retenir la notion d'anticorps préformés car s'il peut exister des anticorps végétaux ce n'est pas à la faveur de simples extraits aqueux qu'on les met en évidence, et les antigènes correspondants ont bien peu de chance de pénétrer un jour les tissus de la plante où ces anticorps les attendent : on pourrait rapprocher d'une telle interprétation celle qui attribue aux alcaloïdes un rôle de protection de la plante à l'égard des animaux nuisibles et qui ne trouve pas possibilité de se manifester ; ainsi les alcaloïdes de la *Belladone* sont toxiques pour l'homme qui n'en est pourtant pas l'ennemi naturel, alors qu'au contraire ils sont inoffensifs pour les lapins, les lièvres, les oiseaux, les chenilles, les scarabées, les pucerons, qui y exercent leurs ravages.

Mais comme l'a fait remarquer JAMES (20), à propos des alcaloïdes, l'acquisition par une plante de la faculté de les synthétiser peut dériver d'une mutation unique, d'un gène entraînant parfois une chaîne de réactions nouvelles dont l'aboutissement, imprévisible, est une synthèse plus ou moins complexe. Les propriétés des produits terminaux de cette synthèse sont alors entièrement indépendants de la mutation initiale. Et l'auteur anglais pense que c'est ce type de mécanisme qui est à l'origine des multiples composés de la si riche biochimie végétale, sans que ceux-ci, pigments, tanins, polysaccharides, glucosides, alcaloïdes, dussent avoir chacun un rôle essentiel et spécifique. Il ne voit là qu'une preuve de l'imperfection de l'évolution biochimique des végétaux qui n'est pas encore parvenue à son stade ultime et reste encore encombrée de multiples substances superflues. Nous ne voyons pas de raison

actuelle de ne pas admettre semblable origine et pareille signification pour les agglutinines de Papilionacées : elles constitueraient dans la synthèse protidique le résultat d'un *processus* très particulier aboutissant à une substance utilisable par la plante comme réserve azotée et manifestant par ailleurs des propriétés agglutinantes sans aucun rapport avec la biologie du végétal.

Cette théorie une fois admise, il n'en reste pas moins que parmi des Papilionacées, on trouve côte à côte des plantes dont l'agglutinine est polyvalente et d'autres dont l'agglutinine est spécifique de certains antigènes globulaires seulement. Cette différence d'action ne provient sans doute que d'une différence de constitution qu'il nous est facile d'admettre. Néanmoins la connaissance de cette spécificité possible a engendré un certain nombre de recherches dont le but était principalement d'établir les relations d'allure immunologique entre ces agglutinines et les antigènes responsables de la spécificité des globules.

Un aspect très particulier du comportement des agglutinines spécifiques a été mis en lumière par MORGAN et WATKINS (36). Ces auteurs ont, en effet, établi la possibilité d'inhiber certaines de ces agglutinines par la simple addition de composés peu complexes comme des sucres, ou de substance H purifiée. Entre autres l' α Méthyl L fucopyranoside présente pour l'extrait de *Lotus tetragonolobus* une affinité supérieure à celle de la substance H. Les résultats de MORGAN et WATKINS jettent une première clarté sur les groupements dont certaines agglutinines spécifiques peuvent être avides. Or, certains de ces sucres simples (galactose, osamines) figurent précisément dans les molécules présentant une activité Forssman, dont la spécificité leur est liée, et ce pouvoir inhibiteur peut donc témoigner d'une parenté entre les agglutinines végétales qui le subissent et les anticorps hétérophiles de Forssman.

On sait, d'autre part, actuellement, que certaines semences peuvent contenir l'antigène de Forssman : il est alors possible que dans certains cas la coexistence dans une même graine des deux éléments du système [agglutinine-antigène capable de la neutraliser] rende l'agglutinine impossible à déceler. On voit alors combien la répartition systématique des agglutinines peut paraître fortuite.

Mais pour le *Phaseolus vulgaris*, la polyvalence de son agglutinine ne s'accorde pas entièrement avec la distribution de l'antigène de Forssman : si l'on admet que certaines des agglutinines végétales spécifiques sont associées au système de Forssman, il faut penser que d'autres comme celles du *Phaseolus*

se relie à un système d'antigènes hétérophiles différent, l'antigène MIDUGUTI (35), par exemple, dont la répartition dans les globules animaux et la présence dans les organes du cobaye rendraient mieux compte des propriétés de l'agglutinine du *Phaseolus*.

L'observation faite par MORGAN et WATKINS et les interprétations qu'elle suggère nous montre combien le problème des agglutinines végétales se complique un peu plus chaque fois qu'on le pénètre plus avant. Chaque difficulté écartée, chaque imprécision résolue livrent l'accès à des complexités nouvelles. Aussi notre prétention n'est-elle que d'avoir proposé quelques hypothèses sans contradictions avec nos connaissances actuelles.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. BERGER. — Th. Pharm. Toulouse 1953.
2. BIRD. — The Journ. of Immun. Baltimore 1952, 69, 319.
3. BORDUAS, GRABAR. — Ann. Inst. Past. 1953, 84, 303.
4. BOURDILLON. — Bull. Soc. Ch. Biol. 1949, 31, 83.
5. BOYD. — Immun. U.S.A. 1950, 65, 281.
6. BOYD, REGUERA. — Journ. Immun. U.S.A. 1949, 62, 333.
7. BROCC, ROUSSEU, FABRE. — Les Toxines végétales Hermann 1947.
8. CALMETTE, BOQUET, NEGRE, BRETEY. — Manuel Microb. Sérol. Masson 1947.
9. CAPPELLETTI. — Ann. Botan. Syst. 1928, 17, 211.
10. CAZAL, LALAURIE. — Acta Haematol. Bâle 1952, 8, 73.
11. DIACONO. — Trav. Soc. Pharm. Montpellier 1945, 4, 208.
12. DIACONO, MASSA. — Ann. Inst. Past. 1948, 75, 582.
13. EISLER, PORTHEIM. — Zeitsch. Immun. Forsch 1926, 47, 59.
14. ELFSTRAND. — Görbersdorfer Veröffentl. 1898.
15. ELO, ESTOLA, MALSTROM. — Ann. Méd. Exp. Fenn. 1951, 29, 297.
16. GANZIN, MACHEBŒUF. — Bull. Soc. Ch. Biol. 1952, 34, 32.
17. GRABAR, BONNEFOY. — Ann. Inst. Past. 1946, 72, 745.
18. HELLIN. — Inaug. Dissert. Dorpat 1891.
19. HIRSZFELD. — Rev. d'Immun. 1948, 12, 335.
20. JAMES. — Endeavour 1953, 12, 76.
21. KOBERT. — Landw. Vers. Stat. 1913, 79, 97.
22. KOULUMIES. — Ann. Méd. Exp. Biol. Fenn. 1949, 27, 185.
23. KOULUMIES. — Ann. Méd. Exp. Biol. Fenn. 1950, 28, 160.
24. KRUPPE. — Z. Immun. Forsch. 1950, 107, 450.
25. KRUPPE, POWILLEIT. — Z. Hyg. Dtsch. 1952, 134, 198.
26. LANDSTEINER, RAUBITSCHKE. — Central bl. f. Bakt. 1908, 45.
27. LANNI, SHARP, CSAKY, BEARD. — Arch. Biochem. 1950, 28, 313, 660.
28. LAU. — Inaug. Dissert. Rostock 1901.
29. MACHEBŒUF, REBEYROTTE, BRUNERIE. — Bull. Soc. Ch. Biol. 1951, 33, 1543.
30. MACHEBŒUF, REBEYROTTE, DUBERT, BRUNERIE. — Bull. Soc. Ch. Biol. 1953, 35, 334.
31. MARCHAL. — C. R. Soc. Biol. 1942, 136, 760.

32. MARCHAL, SCHWARTZ, MULLER. — C. R. Soc. Biol. 1945, 139, 481.
 33. MARCUSSEON, BEGUN. — Zeitsch. Imm. Forsch. 1925, 45, 49.
 34. MENDEL. — Arch. d. Fisiol. 1909, 7, 168.
 35. MIDUGUTI In DUJARRIC DE LA RIVIERE EYQUEM. — Les groupes sanguins des animaux. Flammarion 1953, p. 128.
 36. MORGAN, WATKINS. — The Brit. J. of Exp. path. 1953, 34, 94.
 37. MOULE. — Bull. Soc. Ch. Biol. 1951, 33, 1461 et 1467.
 38. PARTRIDGE. — Nature 1949, 164, 443.
 39. RAYNAUD, ROBERT, D'ESHOUGUES, PASQUET, DIGIOVANNI. — Alg. Méd. 1953, 57, 721.
 40. RENKONEN. — Ann. Méd. Exp. Bil. Fenn. 1948, 26, 66.
 41. RENKONEN. — Ann. Méd. Exp. Bil. Fenn. 1950, 28, 45.
 42. RENKONEN, THERMAN. — Ann. Méd. Exp. Biol. Fenn. 1952, 30, 327.
 43. SCHNEIDER J. — Biol. Chem. 1912, 11, 47.
 44. SOHIER, KOURILSKY. — Ann. Biol. Cl. 1950, 4, 382 et 529.
 45. STILLMARK. — Arb. a. d. Pharm. Inst. zu Dorpat, Stuttgart 1889.
 46. STULBERG, SCHAPIRA, ROBINSON, BABINSKY, FREUND. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Méd. 1951, 76, 704.
 47. SUMNER, GRAHAM J. — Biol. Chem. 1925, 64, 257.
 48. WIENHAUS. — Biochem. zeitschr. 1909, 18, 228.
-

Montpellier, le 26 mai 1954.

VU :

Le Doyen,
E. CANALS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 28 mai 1954.

POUR LE RECTEUR :

Le Vice-Président du Conseil
de l'Université,
G. GIRAUD.

TABLE DES MATIERES

I. — INTRODUCTION	11
<i>Considérations techniques</i>	
Influence de la suspension globulaire	15
— de la température	17
— du temps de contact	18
— de la centrifugation	18
— de l'addition de substances étrangères..	19
Causes d'erreurs	19
II. — ÉTUDE DE LA RÉPARTITION DES PHYTOAGGLUTININES PAR RAPPORT A LA CLASSIFICATION SYSTÉMATIQUE,	23
Liste des plantes ayant servi à la recherche d'agglutininnes	26
Résumé de la répartition des agglutinines chez les légumineuses	34
Conclusion	35
III. — ÉTUDE DE LA PHYTOAGGLUTININE DANS LA PLANTE,	37
Dépistage dans les organes de <i>Vicia sepium</i> récoltée dans la nature	41
Répartition dans les étages foliaires de <i>Vicia sepium</i>	42
Etude systématique au cours du développement en culture chez <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	44
Relations entre les cotylédons et les feuilles primordiales	46
Conclusion	47
IV. — ÉTUDES DE QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AGGLUTININE DU <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> ,	49
Action de la température	58
— du ph	59
— du sulfate d'ammonium	60
— de l'alcool	64
Application de l'électrophorèse	65
Conclusion	68

V. — ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE LA PHYTOAGGLUTININE ENVISAGÉE SOUS L'ANGLE SÉROLOGIQUE.	71
A. — <i>Etude directe des propriétés de l'agglutinine végétale</i>	
1° Action sur les différents groupes d'hématies....	75
2° Absorption par les hématies des divers groupes. .	76
3° Neutralisation croisée entre l'agglutinine végétale et les agglutinines humaines	77
4° Action de l'extrait de rein de cobaye, riche en anti-gène de Forssman	82
5° Influence de l'addition de plasma albumine de bœuf ou de Dextran	85
6° Action du formol	88
7° Recherche d'un pouvoir hémolytique	88
8° Comparaison de l'agglutinine végétale avec une agglutinine virale	90
9° Action sur quelques suspensions microbiennes . .	90
B. — <i>Etude des propriétés d'antisérums expérimentaux obtenus à l'aide de l'extrait végétal</i>	
1° Obtention des antisérums	91
2° Floculation de l'extrait de Phaseolus par les antisérums	94
3° Application de l'hémagglutinine passive à l'étude de l'extrait de Phaseolus et de son antisérum ..	96
4° Utilisation d'hématies tannées pour l'hémagglutination passive	98
5° Action d'un antisérum sur un sérum humain riche en anticorps hétérophiles	100
6° Action des antisérums sur les sérums humains anti A et anti B	102
7° Action d'un antisérum sur différents extraits végétaux	104
VI. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	107
BIBLIOGRAPHIE.	115

